



**EFEK *EPIGALLOCATECHIN-3-GALLATE* (EGCG) TOPIKAL  
TERHADAP SEBUKAN NEUTROFIL KONJUNGITIVITIS ALERGI  
PADA MODEL TIKUS WISTAR**

**Laporan Akhir Penelitian**

**Karya Tulis Ilmiah**

Diajukan untuk memenuhi tugas dan melengkapi  
Persyaratan dalam menempuh Program Pendidikan Sarjana  
Fakultas Kedokteran

Disusun oleh :

**CHRISTIAN BETA KURNIAWAN**

**NIM : G2A005043**

**FAKULTAS KEDOKTERAN  
UNIVERSITAS DIPONEGORO  
SEMARANG**

**2009**

## **HALAMAN PENGESAHAN**

### **Laporan Akhir Penelitian Karya Tulis Ilmiah**

#### **EFEK *EPIGALLOCATECHIN-3-GALLATE* (EGCG) TOPIKAL TERHADAP SEBUKAN NEUTROFIL KONJUNGTIVITIS ALERGI PADA MODEL TIKUS WISTAR**

Telah diuji dan dipertahankan di hadapan Tim Penguji Karya Tulis Ilmiah Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro pada tanggal 15 Agustus 2009 dan telah diperbaiki sesuai dengan saran-saran yang diberikan.

Semarang, 24 Agustus 2009

Ketua Penguji

Penguji

dr. Ika Pawitra Miranti, M.Kes, Sp.PA  
NIP. 131 875 465

dr. Awal Prasetyo, M.Kes, Sp.THT-KL  
NIP. 132 163 893

Pembimbing

dr. Trilaksana Nugroho, M.Kes, Sp.M  
NIP. 132 233 165

## DAFTAR ISI

Halaman Judul .....	i
Halaman Pengesahan .....	ii
Daftar Isi .....	iii
Daftar Gambar .....	vi
Daftar Tabel .....	vii
Daftar Lampiran .....	viii
Abstrak .....	ix
BAB 1 PENDAHULUAN .....	1
1.1. Latar Belakang .....	1
1.2. Perumusan Masalah .....	3
1.3. Tujuan Penelitian .....	4
1.3.1. Tujuan Umum .....	4
1.3.2. Tujuan Khusus .....	4
1.4. Manfaat Penelitian .....	5
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA .....	6
2.1. Perbandingan antara Konjungtiva Manusia dan Tikus .....	6
2.2. Hipersensitivitas dan Alergi.....	8
2.3. Sel-Sel Efektor pada Reaksi Alergi .....	9
2.3.1. Sel Mast .....	9
2.3.2. Basofil .....	11
2.3.3. Eosinofil .....	12

2.3.4. Th2 .....	14
2.3.5. Neutrofil .....	15
2.4. Tinjauan Klinis dan Histopatologis Konjungtivitis Alergi .....	17
2.5. Compound 48/80 .....	18
2.6. Agen Antialergi .....	19
2.7. EGCG Teh Hijau .....	20
2.8. Efek EGCG terhadap Sistem Imun .....	21
2.9. Farmakokinetika Obat Tetes Mata .....	24
2.10. Kerangka Teori .....	25
2.11. Kerangka Konsep .....	26
2.12. Hipotesis .....	26
2.12.1. Hipotesis Mayor .....	26
2.12.2. Hipotesis Minor .....	26
<b>BAB 3 METODE PENELITIAN .....</b>	<b>27</b>
3.1. Ruang Lingkup .....	27
3.2. Waktu dan Tempat Penelitian .....	27
3.3. Jenis dan Rancangan Penelitian .....	27
3.4. Sampel Penelitian .....	29
3.4.1. Sampel .....	29
3.4.2. Cara Pengambilan Sampel .....	29
3.4.3. Besar Sampel .....	29
3.5. Variabel Penelitian .....	29
3.5.1. Variabel Bebas .....	29

3.5.2. Variabel Terikat .....	30
3.6. Definisi Operasional .....	30
3.7. Alat dan Bahan Penelitian .....	31
3.7.1. Alat .....	31
3.7.2. Bahan dan Materi .....	32
3.8. Cara Kerja .....	33
3.9. Alur Penelitian .....	35
3.10. Analisis Data .....	35
BAB 4 HASIL PENELITIAN .....	37
4.1. Analisis Sampel .....	37
4.2. Analisis Deskriptif .....	37
4.3. Analisis Inferensial .....	38
BAB 5 PEMBAHASAN .....	41
BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN .....	48
6.1. Kesimpulan .....	48
6.2. Saran .....	49
DAFTAR PUSTAKA .....	50
LAMPIRAN	

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Grafik <i>Box- plot</i> sebaran neutrofil konjungtivitis alergi pada tikus Wistar kelompok K, P1, P2, dan P3 .....	38
Gambar 2. Gambaran histopatologis konjungtiva tikus Wistar dengan pemberian EGCG 5 x 10 <sup>-2</sup> mg/ml (P1) dan 5 x 100 mg/ml (P3) .....	45
Gambar 3. Gambaran histopatologis konjungtiva tikus Wistar dengan pemberian air mata artifisial (K) dan EGCG 5 x 10 <sup>-1</sup> mg/ml (P2) .....	46

## DAFTAR TABEL

Tabel 1.	Rerata sebulan neutrofil konjungtivitis alergi pada tikus Wistar tiap kelompok perlakuan .....	37
Tabel 2.	Nilai perbandingan hasil uji <i>Post Hoc (Bonferroni)</i> terhadap sebulan neutrofil konjungtivitis alergi pada tikus Wistar antara tiap kelompok perlakuan .....	39

## **DAFTAR LAMPIRAN**

Lampiran 1: Rerata jumlah neutrofil pada jaringan konjungtiva tiap lapangan pandang

Lampiran 2: Hasil Uji Statistik



**Efek *Epigallocatechin-3-gallate* (EGCG) Topikal terhadap  
Sebukan Neutrofil Konjungtivitis Alergi  
pada Model Tikus Wistar**

Christian Beta Kurniawan \*, Trilaksana Nugroho \*\*

**ABSTRAK**

**Latar belakang:** *Epigallocatechin-3-Gallate* (EGCG), suatu polifenol yang banyak terdapat pada tumbuhan teh (*Camellia sinensis*) terutama teh hijau mempunyai efek antiinflamasi, antioksidan, antiproliferatif, dan antialergi. Sejauh ini belum ada penelitian mengenai efek antialergi EGCG terhadap mata.

**Tujuan:** Membuktikan pemberian EGCG topikal dapat menekan sebukan neutrofil konjungtivitis alergi tikus Wistar yang diinduksi *Compound 48/80*.

**Metode:** Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan rancangan *post test only control group design* menggunakan 24 ekor tikus Wistar betina terbagi dalam 4 kelompok secara random. Kelompok K: diberi tetes mata air mata artifisial 1 tetes/mata tiap 10 menit selama 1 jam. P1: diberi tetes mata EGCG  $5 \times 10^{-2}$  mg/ml. P2: diberi tetes mata EGCG  $5 \times 10^{-1}$  mg/ml. P3: diberi tetes mata EGCG  $5 \times 10^0$  mg/ml. EGCG diberikan 1 tetes/mata tiap 10 menit selama 1 jam dan kemudian setiap tikus diberi 1 tetes *Compound 48/80* 250 µg/mata segera setelahnya. Satu jam setelah pemberian *Compound 48/80*, dilakukan pengambilan jaringan konjungtiva untuk pemeriksaan histopatologi. Analisis data menggunakan uji *One-Way ANOVA* dan *Post Hoc*.

**Hasil:** Rerata sebukan neutrofil tertinggi terdapat pada kelompok P3 ( $43,67 \pm 9,81$ ), diikuti oleh K, P1, dan P2. Uji *One-Way ANOVA* menunjukkan adanya perbedaan bermakna. Uji *Post Hoc* menunjukkan adanya perbedaan bermakna antara K dengan P2, K dengan P3, P1 dengan P2, P1 dengan P3, dan P2 dengan P3; sedangkan antara K dengan P1 tidak ada perbedaan bermakna ( $p > 0,05$ ).

**Kesimpulan:** Pemberian EGCG topikal dosis tertentu ( $5 \times 10^{-1}$  mg/ml) mampu menekan sebukan neutrofil konjungtivitis alergi pada tikus Wistar secara signifikan, sedangkan dosis yang lebih tinggi ( $5 \times 10^0$  mg/ml) meningkatkan sebukan neutrofil. EGCG pada dosis yang lebih besar ini kemungkinan besar menimbulkan iritasi dan inflamasi pada konjungtiva tikus Wistar.

**Kata Kunci:** EGCG, sebukan neutrofil, konjungtivitis alergi, *Compound 48/80*.

\* Mahasiswa Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang

\*\* Staf pengajar bagian Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang

***The Effect of Topical Epigallocatechin-3-Gallate (EGCG) on Neutrophil Infiltration in a Wistar Rat model of Allergic Conjunctivitis***

*Christian Beta Kurniawan \*, Trilaksana Nugroho \*\**

**ABSTRACT**

**Background:** Epigallocatechin-3-Gallate (EGCG), the abundant polyphenol in tea plant (*Camellia sinensis*) specially in green tea, has demonstrated antiinflammatory, antioxidant, antiproliferative, and antiallergic activity. Thus far, there had not any researches been done about the antiallergic effect of EGCG on the eyes.

**Objectives:** Proving the effect of topical EGCG in reducing neutrophil infiltration in a Wistar rat model of allergic conjunctivitis induced by Compound 48/80.

**Methods:** This was a experimental study using post test only control group design on 24 female Wistar rats, randomly labeled into 4 groups. Group K: administered with artificial tears a drop per eye every 10 minutes for an hour. P1: administered with  $5 \times 10^{-2}$  mg/ml EGCG. P2: administered with  $5 \times 10^{-1}$  mg/ml EGCG. P3: administered with  $5 \times 10^0$  mg/ml EGCG. EGCG was administered one drop per eye every 10 minutes for an hour and then all groups were administered with one drop 250  $\mu$ g Compound 48/80 per eye right after. One hour after the administration of Compound 48/80, the conjunctivas were removed for histopathological examination. The data were analyzed using One-Way ANOVA and Post Hoc test.

**Results:** The highest mean score of neutrophil infiltration occurred in group P3 ( $43.67 \pm 9.81$ ), followed by K, P1, and P2. One-Way ANOVA test showed significant difference among all groups. Post Hoc test showed significant difference between K vs P2, K vs P3, P1 vs P2, P1 vs P3, and P2 vs P3; but no significant difference between K vs P1 ( $p > 0.05$ ).

**Conclusions:** Topical application of certain dose of EGCG ( $5 \times 10^{-1}$  mg/ml) could significantly reduce neutrophil infiltration in a Wistar rat model of allergic conjunctivitis, while application of higher dose ( $5 \times 10^0$  mg/ml) increased neutrophil infiltration. It suggested that this higher dose of EGCG might lead to irritation and inflammation of Wistar rat conjunctiva.

**Keywords:** EGCG, neutrophil infiltration, allergic conjunctivitis, Compound 48/80.

\* Student of Medical Faculty of Diponegoro University Semarang

\*\*Lecturer of Department of Pharmacology, Medical Faculty of Diponegoro University Semarang

## **BAB 1**

### **PENDAHULUAN**

#### **1.1 Latar Belakang**

Sekitar 15 sampai 20% dari populasi yang ada menderita beberapa bentuk penyakit alergi dan insidensinya sepertinya akan terus meningkat, bahkan sekitar 6 juta dolar Amerika diperkirakan telah dibelanjakan untuk mengatasi penyakit rhinokonjungtivitis alergi.<sup>1-2</sup> Penelitian-penelitian yang telah banyak dilakukan pada umumnya berfokus pada patofisiologi rhinitis alergi dan asma, sedangkan penelitian tentang penyakit alergi pada mata masih sedikit dilakukan.<sup>3</sup> Penyakit alergi pada mata sering sekali ditemukan dan suatu penelitian memperlihatkan bahwa sekitar 32% dari seluruh anak yang menderita penyakit atau kondisi alergi, manifestasi yang pertama kali timbul adalah alergi pada mata.<sup>4</sup>

Penyakit-penyakit alergi pada mata antara lain konjungtivitis alergi, keratokonjungtivitis vernalis, keratokonjungtivitis atopik, *contact lens associated papillary conjunctivitis*, dan *contact ocular allergy*.<sup>5</sup> Konjungtivitis alergi merupakan salah satu bentuk manifestasi respon imun spesifik terhadap suatu antigen yang disebut alergen, di mana alergen tersebut akan terikat pada IgE di permukaan sel mast, dan menginduksi suatu respon akut yang diperantarai sel mast.<sup>6</sup> Paparan alergen pada konjungtiva akan mengakibatkan alergen tersebut ditangkap oleh IgE yang ada di permukaan sel mast. Hal ini akan mengakibatkan degranulasi sel mast, sehingga sel mast mengeluarkan mediator-mediator yang akan mengakibatkan gejala seperti gatal, mata merah berair, dan bengkak, namun

tidak sakit.<sup>7</sup> Tahap ini disebut reaksi fase cepat. Setelah itu akan terjadi reaksi fase lambat setelah 4-24 jam, yang ditandai dengan infiltrasi eosinofil, neutrofil, limfosit, dan makrofag.<sup>8,9</sup> Pada reaksi fase lambat ini, infiltrasi leukosit yang dominan pada jaringan konjungtiva adalah eosinofil dan neutrofil.<sup>9</sup>

Berdasarkan patofisiologi konjungtivitis alergi, di mana terjadi degranulasi sel mast yang menyebabkan pelepasan mediator-mediator inflamasi seperti histamin, prostaglandin, leukotrien, maupun faktor-faktor kemotaktik eosinofil, neutrofil dan leukosit lain, maka penanganan konjungtivitis alergi secara medikamentosa dapat diberikan anti-histamin, vasokonstriktor, stabilisator sel mast, kortikosteroid, dan anti-inflamasi non-steroid (AINS).<sup>10</sup> Namun, seperti layaknya obat-obatan lain, efek samping yang ada menjadi kendala tersendiri, padahal konjungtivitis alergi merupakan penyakit yang berulang.

Masyarakat kini mulai berpaling kepada bahan-bahan alami sebagai "obat" untuk berbagai macam penyakit. Bahan-bahan alami dianggap lebih aman dibandingkan obat-obat yang dibuat dari bahan kimia. *Epigallocatechin-3-Gallate* (EGCG), suatu polifenol yang banyak terdapat pada tumbuhan teh (*Camellia sinensis*) terutama teh hijau, merupakan suatu bahan alami yang telah banyak diteliti. EGCG mempunyai efek antiinflamasi, antioksidan, antiproliferatif, dan antialergi,<sup>11-15</sup> namun belum ada penelitian yang membuktikan efek antialergi dan keamanan EGCG terhadap mata. Selain itu, penggunaan teh hijau secara umum maupun bahan aktifnya seperti EGCG selama ini lebih banyak digunakan secara oral, namun penggunaan topikal pada mata khususnya konjungtiva belum pernah dilakukan.

*Compound 48/80* adalah suatu bahan dapat menginduksi degranulasi sel mast dan melepaskan mediator histamin.<sup>16</sup> Aplikasi secara topikal *Compound 48/80* dengan dosis 250 µg pada mata tikus mampu menimbulkan perubahan secara klinis maupun histopatologi yang menyerupai konjungtivitis alergi pada manusia.<sup>17,18</sup> Secara klinis nampak adanya iritasi pada konjungtiva, eritema, *chemosis*, dan adanya *discharge*. Pemeriksaan histopatologis menunjukkan infiltrasi neutrofil, makrofag, limfosit T CD4+, dan sejumlah kecil eosinofil.<sup>19</sup> Sebulan leukosit yang paling dominan pada konjungtivitis alergi yang diinduksi oleh *Compound 48/80* adalah neutrofil dan hanya ditemukan sebulan eosinofil yang minimal.<sup>19,20</sup>

Bukti ilmiah tentang khasiat penggunaan EGCG topikal pada mata, khususnya sebagai bahan antialergi, sampai saat ini belum didapatkannya. Penelitian ini menggunakan suatu model konjungtivitis alergi pada tikus Wistar yang diinduksi dengan *Compound 48/80* yang sebelumnya telah diberikan EGCG *pretreatment* dalam berbagai dosis secara topikal (tetes mata) untuk mengetahui efek EGCG pada konjungtivitis alergi. Penelitian ini dirancang sedemikian rupa sehingga perubahan yang diakibatkan pemaparan suatu bahan (EGCG) terhadap gambaran histopatologi, khususnya sebulan neutrofil pada keadaan model patologis yang dikehendaki (reaksi alergi) dapat diamati.

## **1.2. Perumusan Masalah**

Apakah EGCG topikal dapat menekan sebulan neutrofil konjungtivitis alergi pada tikus Wistar yang diinduksi dengan *Compound 48/80* topikal ?

### **1.3. Tujuan Penelitian**

#### **1.3.1. Tujuan Umum**

Membuktikan bahwa pemberian EGCG topikal dapat menekan sebaran neutrofil konjungtivitis alergi pada tikus Wistar yang diinduksi *Compound 48/80* topikal.

#### **1.3.2. Tujuan Khusus**

1. Menghitung sebaran neutrofil konjungtivitis alergi pada tikus Wistar yang mendapat tetes mata air mata buatan.
2. Menghitung sebaran neutrofil konjungtivitis alergi pada tikus Wistar yang mendapat EGCG topikal dosis  $5 \times 10^{-2}$  mg/ml.
3. Menghitung sebaran neutrofil konjungtivitis alergi pada tikus Wistar yang mendapat EGCG topikal dosis  $5 \times 10^{-1}$  mg/ml.
4. Menghitung sebaran neutrofil konjungtivitis alergi pada tikus Wistar yang mendapat EGCG topikal dosis  $5 \times 10^0$  mg/ml.
5. Membandingkan perlakuan pada kelompok (1) dan (2).
6. Membandingkan perlakuan pada kelompok (1) dan (3).
7. Membandingkan perlakuan pada kelompok (1) dan (4).
8. Membandingkan perlakuan pada kelompok (2) dan (3).
9. Membandingkan perlakuan pada kelompok (2) dan (4).
10. Membandingkan perlakuan pada kelompok (3) dan (4).

#### **1.4. Manfaat Penelitian**

Hasil penelitian ini diharapkan dapat :

- Memberikan kontribusi dan melengkapi informasi ilmiah mengenai efek antialergi EGCG topikal pada konjungtivitis alergi.
- Memberikan landasan ilmiah untuk pengembangan dan pemanfaatan EGCG di bidang kesehatan mata, terutama penanganan penyakit konjungtivitis alergi maupun penyakit alergi pada mata yang lain.
- Memberikan landasan ilmiah untuk pengembangan EGCG dalam menangani berbagai macam gangguan maupun penyakit radang pada mata.

## **BAB 2**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **2.1. Perbandingan antara Konjungtiva Manusia dan Tikus**

Konjungtiva adalah membran mukosa yang vaskuler, transparan dan tipis yang terdiri dari konjungtiva palpebralis, konjungtiva bulbaris, dan konjungtiva fornicis.<sup>21</sup> Lapisan epitel konjungtiva tidak berkeratin, terdiri dari dua hingga lima lapis sel epitel silinder atau kuboid bertingkat. Lapisan epitel mengandung sel-sel goblet yang mensekresi mukus dan membran mukosa yang mengalami invaginasi sehingga membentuk kantung yang disebut Kripte *Henle*.<sup>21-23</sup> Sel-sel inflamasi dan antibodi dapat berakumulasi di dalamnya sehingga berfungsi sebagai suatu sawar imunologi konjungtiva terhadap infeksi, alergi, dan trauma.<sup>22</sup>

Lapisan membrana basalis dan stroma konjungtiva (*substantia propria*) terdapat di profunda lapisan epitel. Stroma merupakan suatu jaringan ikat fibrovaskuler yang berfungsi sebagai penyokong konjungtiva, serta mengandung pembuluh darah, pembuluh limfe, neuron dan sel-sel inflamasi.<sup>23,24</sup> Stroma mengandung jaringan limfoid dan di beberapa tempat dapat mengandung struktur semacam folikel tanpa sentrum germinativum.<sup>21</sup>

Jaringan konjungtiva mempunyai vaskularisasi dan sistem limfe yang baik. Selain itu konjungtiva juga kaya akan sel-sel *Langerhans*, sel-sel dendritik, dan makrofag yang berperan sebagai *Antigen Presenting Cell* (APC) yang potensial. Folikel-folikel yang membesar setelah proses inflamasi dan infeksi pada mata menunjukkan pengumpulan sel-sel limfosit T, limfosit B, dan APC di



dalamnya. Hal ini menunjukkan bahwa folikel berperan sebagai tempat untuk melokalisasi proses imun terhadap antigen yang lolos menembus lapisan epitel. Sel-sel efektor lain, terutama sel mast, juga banyak terdapat di dalam substantia propria dan hampir semua kelas antibodi terdapat dalam konjungtiva terutama IgA yang disekresi ke dalam *tear film*. Konjungtiva juga mengandung molekul *soluble* terutama komplemen, serta berperan dalam degranulasi sel mast yang diperantarai IgE. Jadi konjungtiva berperan penting di dalam respon efektor imunitas.<sup>25</sup>

Penelitian pada konjungtiva tikus strain *Sprague-Dawley* menemukan bahwa epitel yang melapisi konjungtiva tikus tersebut adalah epitel skuamus berlapis. Pada daerah-daerah tertentu, terdapat suatu cekungan yang dibentuk oleh gugusan sel goblet yang terdapat pada lapisan epitel tersebut. Lapisan epitel skuamus tersebut terdiri atas tiga lapisan, yaitu lapisan sel basal, lapisan sel intermedia yang tersusun dari *wing cells*, dan beberapa lapis sel skuamus pada permukaannya. Sel-sel leukosit mononuklear yang tersusun berkelompok di tempat-tempat tertentu (*isolated*) terdapat pada lapisan sel basal dan intermedia. Dua perbedaan utama antara struktur konjungtiva tikus dan manusia adalah konjungtiva tikus dilapisi epitel skuamus berlapis dan sel-sel gobletnya berkelompok membentuk *cluster*. Epitel skuamus pada konjungtiva manusia hanya terdapat pada daerah perilimbal dan perbatasan konjungtiva dengan palpebra, sedangkan di sebagian besar bagian konjungtiva yang lain terdapat variasi bentuk sel epitel kuboid dan kolumnar. Bentuk *cluster* sel goblet sebenarnya juga dapat dijumpai pada konjungtiva manusia di daerah lipatan

semilunar dan forniks inferior yang dikenal sebagai Kript *Henle*, selebihnya sel-sel goblet manusia tersebar secara soliter.<sup>26</sup>

Sejumlah limfosit dan makrofag juga tersebar di antara *wing cells* dan sel-sel basal, namun tidak ada sel yang memiliki potensi imunologis yang aktif. Konjungtiva tikus tidak mengandung sel-sel plasma seperti pada manusia maupun folikel limfoid seperti pada kelinci dan *guinea pigs*, sehingga konjungtiva tikus dilaporkan inaktif secara imunologis.<sup>26</sup> Hal ini bertolak belakang dengan berbagai penelitian yang dilakukan selanjutnya menggunakan model konjungtivitis alergi dan konjungtivitis akut pada tikus strain *Sprague–Dawley*, *Lewis*, *Wistar*, *Brown–Norway* yang pada kenyataannya menunjukkan bahwa strain-strain tersebut memiliki respons imunologis yang adekuat atau menyerupai keadaan sesungguhnya pada manusia.<sup>17-19,27</sup> Mencit lebih dipilih dan dianjurkan sebagai model penelitian konjungtivitis alergi secara molekuler.<sup>27</sup>

## **2.2. Hipersensitivitas dan Alergi**

Sistem imun adaptif, dapat menimbulkan reaksi imunologi yang berat dan hebat yang disebut reaksi hipersensitivitas. Hipersensitivitas merupakan kondisi berubahnya respons imunologi, di mana terjadi reaksi imun yang sangat hebat dan berbahaya terhadap masuknya/paparan antigen. Hipersensitivitas juga dapat diartikan sebagai meningkatnya sensitivitas terhadap suatu antigen yang pernah datang sebelumnya. Respon imun yang abnormal ini dapat menimbulkan kerusakan jaringan *host* dan mendasari terjadinya suatu penyakit.<sup>28</sup>

Reaksi hipersensitivitas diklasifikasikan oleh Gell dan Coombs menjadi 4 tipe, yaitu hipersensitivitas tipe I (*anaphylactic/immediate hypersensitivity*), hipersensitivitas tipe II (*cytotoxic reactions*), hipersensitivitas tipe III (*immune-complex-mediated reactions*), dan hipersensitivitas tipe IV (*delayed hypersensitivity*). Pada hipersensitivitas tipe I atau tipe cepat, antigen yang terikat pada IgE yang terlebih dahulu telah berada di permukaan sel mast atau basofil menimbulkan pelepasan mediator-mediator inflamasi seperti histamin, leukotrien, sitokin, metabolit asam arakhidonat, dan mediator enzimatik, yang menghasilkan manifestasi klinik. Contoh dari hipersensitivitas tipe I adalah syok anafilaktik, rhinitis alergi, asma, dan reaksi alergi obat yang akut.<sup>29</sup>

Istilah alergi lebih sering digunakan sebagai sebutan lain dari reaksi hipersensitivitas tipe I, walaupun pada dasarnya alergi adalah status berubahnya respon imun terhadap suatu antigen atau berlaku untuk semua macam tipe reaksi hipersensitivitas. Antigen yang menimbulkan reaksi alergi ini dinamakan alergen.<sup>30</sup> Alergen dapat berupa *pollen*, racun serangga, makanan, obat-obatan dan lain-lain.<sup>31</sup>

## **2.3. Sel-Sel Efektor pada Reaksi Alergi dan Interaksinya**

### **2.3.1. Sel Mast**

Sel mast berperan penting pada reaksi alergi. Reaksi alergi terpacu pada saat alergen berikatan dengan IgE yang terikat pada FcεRI di permukaan sel mast. Sel mast yang teraktivasi akan menginduksi reaksi inflamasi dengan cara melepaskan mediator kimia yang telah ada dan disimpan di dalam granulanya,

serta akan mensintesa dan mensekresi mediator lipid (leukotrien dan prostaglandin) dan sitokin.<sup>31</sup>

Sel mast dalam reaksi alergi akan membangkitkan reaksi yang sangat tidak menyenangkan terhadap antigen yang tidak berbahaya yang tak berhubungan dengan patogen yang harus dieliminir. Konsekuensinya, IgE yang dapat menyebabkan aktivasi sel mast akan tergantung dari dosis antigen dan rute masuknya antigen. Gejalanya bisa ringan berupa iritasi akibat menghirup *pollen* sampai dengan yang berat yang dapat mengancam jiwa seperti syok anafilaktik.<sup>32</sup>

Reaksi alergi dibagi dalam dua fase yaitu respon fase cepat dan inflamasi yang berlarut-larut atau biasa disebut respon fase lambat.<sup>31</sup> Pada respon fase cepat sel mast melepaskan beberapa mediator inflamasi yang telah disimpan di dalam granulanya yang berperan dalam patofisiologi penyakit alergi, salah satu diantaranya adalah histamin. Histamin merupakan mediator vasoaktif yang paling potensial pada fase akut reaksi hipersensitivitas.<sup>33</sup> Histamin menyebabkan vasodilatasi, peningkatan permeabilitas vaskuler, kontraksi otot polos, dan peningkatan produksi mukus. Granula sel mast juga dilepaskan beberapa mediator lain seperti golongan proteoglikan, *neutral proteases*, dan *acid hydrolases*. Sel mast juga mensintesis dan mensekresi mediator lipid seperti leukotrien dan prostaglandin, *platelet activating factor* (PAF). Mediator-mediator lipid seperti leukotrien dan prostaglandin umumnya menyebabkan kontraksi otot polos yang diperpanjang, meningkatkan permeabilitas vaskuler, sekresi mukus, dan sebagai faktor kemotaktik eosinofil dan neutrofil. Sel mast juga memproduksi beberapa macam sitokin seperti sitokin proinflamasi (TNF- $\alpha$ , IL-8, IL-6, dan IL-1 $\alpha$ ), sitokin

imunoregulator (IL-3, IL-4, IL-5, GM-CSF, IL-13, dan IL-16), dan khemokin. Sitokin-sitokin ini berfungsi dalam rekrutmen leukosit yang berperan pada respon fase lambat, serta meregulasi dan mengekalkan respon Th2.<sup>31</sup>

Respon fase lambat melibatkan rekrutmen sel-sel efektor lain seperti limfosit Th2, eosinofil, neutrofil, dan basofil yang secara signifikan menyumbang terjadinya respon alergi. Sel mast selain memainkan peranan dalam aktivasi dan rekrutmen sel-sel efektor pada respon fase lambat, juga memiliki kontribusi dalam remodeling jaringan mukosa yang terjadi secara kronik karena mediator-mediator yang telah dilepaskan mempengaruhi *turnover* jaringan ikat di daerah tersebut, sehingga stabilisator sel mast seperti *sodium nedocromil* efektif menghambat respon fase awal dan respon fase lambat pada proses alergi.<sup>31</sup>

### **2.3.2. Basofil**

Degranulasi sel mast dan aktivasi sel Th2 pada reaksi alergi akan menyebabkan terakumulasinya eosinofil dalam jumlah besar pada tempat terjadinya alergi, serta akumulasi basofil, meskipun tidak sebanyak eosinofil.<sup>32</sup>

Basofil akan mengekspresi FcεRI pada permukaan selnya seperti halnya sel mast. Aktivasi basofil oleh sitokin ataupun antigen akan menyebabkan pelepasan histamin dari granula basofiliknya, LTC<sub>4</sub>, dan sitokin seperti IL-4 dan IL-13.<sup>32</sup>

Sel mast dan basofil memiliki gambaran yang sama secara mikroskopis walaupun pada dasarnya berbeda. Sel mast yang *undifferentiated* bermigrasi dari sumsum tulang menuju ke jaringan konektif pada mukosa dan permukaan epitel

dari tubuh dan maturasi sel mast terjadi di sana. Basofil berbeda dengan sel mast yang mengalami maturasi di perifer. Basofil mengalami diferensiasi dan maturasi di sumsum tulang sebelum masuk ke dalam sirkulasi. Jumlah basofil ini kurang dari 1% dari seluruh leukosit yang ada di dalam sirkulasi darah pada keadaan normal. Basofil mampu bermigrasi ke jaringan sebagai respon terhadap stimulus inflamasi, seperti yang terjadi pada respon alergi fase lambat.<sup>31</sup>

### **2.3.3. Eosinofil**

Eosinofil merupakan granulosit yang berasal dari sumsum tulang dan dapat diidentifikasi di darah dan jaringan karena memiliki granula berwarna merah pada pengecatan menggunakan *acidic eosin*.<sup>31,32</sup> Normalnya eosinofil hanya ada sedikit di sirkulasi darah, dan kebanyakan ditemukan di jaringan, terutama di jaringan ikat seperti saluran nafas, usus, epitel urogenital.<sup>32</sup>

Eosinofil ini mempunyai 2 fungsi efektor. Pertama, pada saat teraktivasi ia akan melepaskan granula toksik dan radikal bebas, yang selain dapat membunuh mikroorganisme dan parasit juga dapat menyebabkan kerusakan jaringan akibat reaksi alergi. Kedua, aktivasi eosinofil akan menginduksi disintesisnya mediator-mediator kimia seperti prostaglandin, leukotrien, dan sitokin yang dapat memperbesar respon inflamasi dengan cara mengaktifkan sel epitel, merekrut dan mengaktifkan lebih banyak sel-sel eosinofil dan leukosit.<sup>32</sup>

Degranulasi sel mast dan aktivasi Th2 pada reaksi alergi lokal menyebabkan eosinofil terakumulasi dalam jumlah besar dan siap untuk diaktifkan. Th2 yang teraktivasi akan melepaskan IL-5 yang meningkatkan

produksi eosinofil sumsum tulang dan melepaskannya ke dalam sirkulasi darah. Sekelompok pengontrol seperti CC khemokin (eotaxin 1 dan eotaxin 2) mengatur kemotaksis eosinofil ke jaringan. Reseptor untuk eotaxin pada eosinofil disebut CCR3. Reseptor ini juga mengikat CC khemokin lain seperti *Membrane Cofactor of Proteolysis* (MCP)-3, MCP-4, dan RANTES yang juga menginduksi kemotaksis eosinofil. Kehadiran eosinofil tersebut menandakan terjadinya inflamasi alergi kronik dan menyebabkan terjadinya kerusakan jaringan.<sup>32</sup>

Fungsi efektor eosinofil diperantarai oleh stimulus yang menginduksi degranulasi. Degranulasi eosinofil diregulasi bermacam-macam komponen, seperti immunoglobulin, mediator lipid, sitokin dan khemokin. Eosinofil mampu mengekspresikan reseptor untuk IgA, IgE, dan IgG, sehingga antigen yang terikat pada antibodi ini mampu menginduksi degranulasi. Sitokin seperti GM-CSF dan IL-5, merupakan *inducer* yang potensial untuk pelepasan granula eosinofil, bahkan protein dari granula eosinofil sendiri seperti *major basic protein* (MBP) dan *eosinophil peroxidase* (EPO), mampu menstimulasi degranulasi eosinofil. Beberapa khemokin, *platelet activating factor* (PAF), C5a dan C3a, *neuropeptide substance P* juga dapat menginduksi degranulasi eosinofil.<sup>31</sup>

Degranulasi eosinofil menyebabkan pelepasan beberapa protein seperti MBP, EPO, *eosinophil-derived neurotoxin* (EDN), dan *eosinophil cationic protein* (ECP). MBP, EPO, dan ECP secara adekuat berfungsi sebagai mediator pada penyakit alergi seperti asma, dermatitis atopi, dan rhinitis alergi. Mekanisme toksisitas MBP dan ECP adalah dengan merusak sel membrane target melalui *charge-mediated interactions*. MBP juga mengaktivasi *platelet*, sel mast, dan

basofil, yang nantinya akan melepaskan histamin. Stimulasi pada eosinofil juga akan menginduksi pembentukan mediator-mediator lipid, yang merupakan produk-produk dari jalur 5- dan 15-lipoksigenase, siklooksigenase, dan PAF.<sup>31</sup> Mediator-mediator lipid ini kembali memperbesar dan memperkuat proses inflamasi yang terjadi, baik secara langsung maupun melalui rekrutmen leukosit yang lebih banyak lagi.<sup>8</sup> Eosinofil juga mampu menghasilkan sitokin seperti IL-3, IL-5, IL-4, IL-10, IL-12, serta khemokin seperti RANTES, MIP-1a, dan eotaxin.<sup>31</sup> Sitokin-sitokin ini mampu menginduksi degranulasi sel mast lebih lanjut.<sup>8</sup>

#### **2.3.4. Th2**

Th2 berfungsi menghasilkan sitokin yang akan meregulasi inflamasi alergi. Sitokin tersebut IL-4, IL-13, dan IL-5 secara *overlapping* meregulasi perkembangan, rekrutmen, dan aktivasi eosinofil. IL-4 dan IL-13 mempunyai kontribusi dalam rekrutmen eosinofil ke daerah inflamasi.<sup>34</sup> IL-4 diperlukan untuk menginduksi sel B mensintesis IgE, dengan mekanisme *isotype switching* ke IgE, sehingga produksi IgE meningkat.<sup>31,35</sup>

Pemahaman terbaru tentang peran sel Th2 pada reaksi alergi menunjukkan bahwa sel Th2 juga merupakan sel efektor pada respon alergi selain fungsi utama mereka sebagai regulator pada proses inflamasi. Sitokin dari sel Th2 yaitu IL-13 terbukti sebagai salah satu molekul efektor pada penyakit alergi. Bukti menunjukkan bahwa blokade terhadap IL-13 endogen oleh *IL-13 receptor antagonist* pada tikus dapat menghilangkan secara sempurna *allergen-induced airway hyperreactivity* (AHR) dan hiperplasia sel mukus paru. Rekombinan IL-13



terbukti menimbulkan gejala asma (hiperresponsif jalan nafas, hipersekresi mukus, eosinofilia) walaupun tanpa adanya sel T fungsional atau sel B.<sup>31</sup>

### 2.3.5. Neutrofil

Neutrofil berperan penting baik dalam fungsi imunitas maupun terjadinya inflamasi. Jumlah neutrofil normal adalah sekitar 40-50% dari seluruh leukosit yang ada di dalam sirkulasi. Karakteristik neutrofil adalah memiliki nukleus dengan multi lobus, granula azurofilik, dan granula spesifik yang berwarna ungu pucat pada pengecatan Wright's dan Giemsa.<sup>36</sup> Neutrofil yang telah mengalami maturasi di sumsum tulang dilepaskan ke sirkulasi dan dapat direkrut ke jaringan yang mengalami inflamasi oleh pengaruh mediator terlarut, terutama IL-8.<sup>37</sup> Neutrofil adalah sel yang memiliki peran terpenting dalam inflamasi dan secara aktif memfagosit mikroorganisme yang menyerang tubuh.<sup>36</sup>

Kemotaksis atau migrasi neutrofil menuju daerah dirangsang oleh faktor-faktor kemotaktik seperti komplemen (C5a), produk dari bakteri, leukotrien B<sub>4</sub>, IL-8 dan beberapa khemokin seperti MCP-1, MCP-2, MCP-3, *macrophage inflammatory protein-1* (MIP-1) dan RANTES.<sup>36,37</sup> Pada respon alergi, kemotaksis neutrofil diinduksi oleh mediator-mediator yang dilepaskan oleh sel mast seperti *neutrophil chemotactic factors* (NCP),<sup>8,38</sup> Prostaglandin D<sub>2</sub> (PGD<sub>2</sub>), Leukotrien B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>),<sup>31</sup> dan histamin.<sup>39</sup> Histamin selain mengaktivasi eosinofil dan neutrofil, juga merupakan kemoatraktan untuk sel-sel ini. Histamin meningkatkan kadar IL-8 dan memacu *rolling* leukosit pada endotel pembuluh darah.<sup>39</sup> Pada *guinea pigs* juga terbukti bahwa *tryptase* yang dilepaskan sel mast

mampu menimbulkan akumulasi neutrofil dan eosinofil pada jaringan.<sup>40</sup> Sitokin dan khemokin yang dihasilkan sel mast seperti TNF- $\alpha$ , IL-8, IL-6, IL-1 $\alpha$ , MCP-1, dan MIP-1 mempunyai kontribusi dalam rekrutmen leukosit pada respon alergi fase lambat, termasuk neutrofil.<sup>31</sup>

Neutrofil memiliki granula yang mengandung protein efektor yang berfungsi dalam fagositosis intraselular maupun untuk dilepaskan ke ekstrasel yang memperbesar inflamasi jaringan. *NADPH oxidase enzyme complex* merupakan komponen paling krusial dalam mekanisme pertahanan tubuh oleh neutrofil. Enzim ini mengkatalisa produksi anion superoksida dari molekul oksigen dan elektron bebas. Superoksida nantinya akan diubah menjadi hidrogen peroksida yang toksik dan dapat menyebabkan kematian bakteri yang telah difagosit.<sup>37</sup>

Neutrofil yang aktif mampu secara langsung mengaktivasi sel mast untuk melepaskan mediator-mediator inflamasi.<sup>8</sup> Selama aktivasi, neutrofil juga melepaskan beberapa produk atau substansinya ke ekstrasel. Substansi tersebut antara lain enzim lisosomal, produk radikal oksigen seperti superoksida, dan produk-produk metabolisme asam arakhidonat termasuk prostaglandin dan leukotrien.<sup>37,41</sup> Prostaglandin menyebabkan vasodilatasi dan peningkatan permeabilitas pembuluh darah yang potensial dalam pembentukan edema. LTB<sub>4</sub> merupakan produk utama dari jalur lipoksigenase pada neutrofil. LTB<sub>4</sub> merupakan agen kemotaktik yang potensial dan aktivator neutrofil untuk melakukan fungsi dan perannya. LTB<sub>4</sub> mengaktivasi neutrofil untuk melakukan agregasi dan adhesi leukosit pada endotel pembuluh darah, membentuk radikal oksigen bebas, dan

melepaskan enzim lisosomal.<sup>41</sup> LTB<sub>4</sub> juga merupakan faktor kemotaktik yang sangat potensial bagi eosinofil dan monosit, selain terhadap neutrofil. LTB<sub>4</sub> menyebabkan sel-sel ini bergerak menuju jaringan yang mengalami proses alergi.<sup>8</sup>

Semua substansi ini dapat menyebabkan kerusakan endotel, kerusakan jaringan, dan dapat mengamplifikasi proses yang telah terjadi. Semua efek ini pada akhirnya dapat menambah dan memperbesar inflamasi jaringan yang telah terjadi.<sup>37,41</sup> Neutrofil juga mampu menghasilkan mediator proinflamasi seperti IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, GM-CSF, G-CSF, dan *plasminogen activator*.<sup>37</sup> Sitokin-sitokin ini mampu menginduksi degranulasi sel mast lebih lanjut.<sup>8</sup>

#### **2.4. Tinjauan Klinis dan Histopatologis Konjungtivitis Alergi**

Mata merupakan salah satu organ yang sering mengalami alergi, bahkan lebih dari separuh kasus konjungtivitis akut adalah berasal dari proses alergi. Konjungtivitis alergi adalah suatu reaksi hipersensitivitas tipe I (akut) yang diawali oleh adanya alergen yang terikat molekul IgE di sel mast pada konjungtiva manusia yang telah tersensitisasi.<sup>42</sup> Pelepasan mediator-mediator sel mast seperti histamin, bradikinin, PAF dan leukotrien memicu reaksi inflamasi seperti gatal, ruam berwarna kemerahan, khemosis dan ekstrasvasasi leukosit.<sup>43</sup> Perjalanan leukosit dari sirkulasi darah menuju jaringan yang mengalami inflamasi meliputi adhesi sel polimorfonuklear (PMN) pada dinding endotel pembuluh darah, *rolling* PMN, aktivasi kemoatraktan, dan migrasi transendotelial.<sup>41</sup>

Gambaran histopatologik konjungtivitis alergi menunjukkan infiltrasi neutrofil, makrofag, limfosit dan eosinofil pada jaringan konjungtiva.<sup>44</sup> Karakteristik respon alergi fase lambat pada konjungtivitis alergi adalah eosinofilia dan neutrofilia pada jaringan konjungtiva.<sup>9</sup>

## 2.5. Compound 48/80

*Compound 48/80* merupakan produk kondensasi dari N-methyl-p-methoxyphenethylamine dengan formaldehid, yang dapat larut dalam air.<sup>45</sup> *Compound 48/80* ini dapat menginduksi degranulasi sel mast dan melepaskan mediator histamin.<sup>16</sup>

Mekanisme kerja *Compound 48/80* tersebut secara umum adalah menginisiasi pembentukan *superoxide anion* dengan inaktivasi *A-kinase* melalui penurunan konsentrasi cAMP intraselular di sel mast. Pembentukan *superoxide anion* tersebut akan menghasilkan peningkatan kadar kalsium intraselular, di mana hal ini akan menyebabkan pelepasan histamin dari sel mast.<sup>46</sup> Peningkatan kadar kalsium intraselular pada sel mast ini juga akan menginduksi sintesis prostaglandin dan leukotrien dari asam arakhidonat.<sup>47</sup>

Aplikasi secara topikal pada permukaan mata tikus dalam dosis 50-1.000 µg menghasilkan gambaran edema konjungtiva dan pembengkakan palpebra dengan derajat berbeda pada pengamatan.<sup>17</sup> Pemeriksaan histopatologi menunjukkan infiltrasi neutrofil, makrofag, limfosit T CD4+, dan sejumlah kecil eosinofil.<sup>19</sup> Pemeriksaan histopatologi menunjukkan bahwa dari semua leukosit yang ditemukan, jumlah neutrofil paling dominan.<sup>20</sup> Pada aplikasi secara topikal

*Compound 48/80* pada permukaan mata tikus, setelah dilakukan pemeriksaan histologi, didapatkan peningkatan degranulasi sel mast dan infiltrasi neutrofil pada dosis yang semakin tinggi, yaitu dari 250, 500, dan 1.000 µg. Pada dosis 250 dan 1.000 µg, kerusakan epitel dan penurunan jumlah sel mast yang degranulasi didapat 6 jam setelah aplikasi *Compound 48/80*, dan penurunan ini bertahan sampai 72 jam pada tikus yang menerima dosis 1.000 µg. Pada penggunaan dosis 250 µg, jumlah neutrofil meningkat pada jam pertama dan jam keenam, sedangkan pada penggunaan dosis 1.000 µg, jumlah neutrofil meningkat pada jam pertama, jam keenam, dan jam kedua puluh empat.<sup>17</sup> Hal ini menunjukkan adanya hubungan dosis dengan reaksi alergi yang ditimbulkan (*dose-related*) dan hubungan antara durasi dengan reaksi alergi yang ditimbulkan (*time-related*). Dari percobaan sebelumnya dapat disimpulkan bahwa aplikasi *Compound 48/80* secara topikal pada tikus dengan dosis 250 µg akan menghasilkan gambaran yang sangat mirip dengan konjungtivitis alergi pada manusia, secara klinis maupun histopatologis, sehingga hal ini dapat dijadikan sebagai model reaksi alergi dan anafilaksis okuler yang relevan dan praktis.<sup>17,46</sup>

## **2.6. Agen Antialergi**

Penanganan konjungtivitis alergi secara farmakologik dapat menggunakan berbagai jenis obat seperti antihistamin topikal, vasokonstriktor, stabilisator sel mast, antiinflamasi non-steroid (AINS), dan kortikosteroid.,<sup>10</sup> namun beberapa pasien intoleran atau resisten terhadap obat-obatan tersebut. Obat-obat sintetik tersebut juga mempunyai efek samping yang mempengaruhi faal tubuh, sehingga

saat ini berbagai penelitian dilakukan untuk menggali potensi antialergi bahan alami yang pada umumnya memiliki toksisitas yang lebih rendah dibandingkan obat sintetik. Salah satu bahan alami yang telah diteliti secara mendalam adalah *Epigallocatechin-3-Gallate* (EGCG), suatu polifenol yang memiliki potensi antialergi/antihistamin.

## 2.7. EGCG Teh Hijau

Sejak ditemukan di China kuno kurang lebih 5000 tahun yang lalu, teh (*Camellia sinensis*) telah menjadi minuman buatan manusia yang paling banyak dikonsumsi di dunia. Selain aroma dan rasanya yang unik, banyak bangsa dan suku menyatakan bahwa teh memiliki kualitas untuk pengobatan. Banyak bukti ilmiah yang terus berkembang tentang khasiat teh untuk pengobatan. Secara khusus, komponen spesifik dari teh hijau dan teh hitam telah menunjukkan aktivitas yang signifikan sebagai antioksidan, antikanker, dan efek fotoproteksi pada penelitian yang menggunakan model binatang.<sup>48</sup>

Komponen aktif teh yang bertanggung jawab terhadap efek biologi teh dikenal sebagai polifenol. Polifenol yang predominan di dalam teh adalah *catechin*.<sup>49</sup> Senyawa polifenol tersebut merupakan kandungan aktif teh hijau yang memiliki efek terhadap sistem imun. Daun teh hijau kering memiliki kandungan 15-30% senyawa polifenol yang terdiri dari *Epigallocatechin gallate* (EGCG) (59,04%), *Epigallocatechin* (EGC) (19,28%), *Epicatechingallate* (ECG) (13,69%), *Epicatechin* (EC) (6,39%), dan *Gallocatechin* (GC) (1,60%).<sup>50</sup> EGCG merupakan *catechin* utama yang terdapat di ekstrak teh dan merupakan bentuk

yang paling aktif di antara semua jenis *catechin* serta memiliki efek biologi yang paling besar. EGCG memiliki efek antikanker, antialergi, antioksidan, antiinflamasi.<sup>11-15</sup>

EGCG sering disebut sebagai tea catechin; (2R,3R)-2-(3,4,5-Trihydroxyphenyl)-3,4-dihydro-1(2H)-benzopyran-3,5,7-triol 3-(3,4,5-trihydroxy benzoate) atau 3,4-Dihydro-5,7-dihydroxy-2R-(3,4,5-trihydroxyphenyl)-2H-1-benzopyran-3R-yl-3,4,5-trihydroxy-benzoate. Secara fisik, EGCG merupakan suatu ekstrak yang berbentuk serbuk berwarna putih sampai merah muda dengan titik luluh 218<sup>0</sup>C yang larut dalam air dan pelarut organik seperti ethanol dan dimethyl formamide. EGCG stabil di dalam suhu kamar biasa namun bersifat higroskopik dan sensitif terhadap cahaya.<sup>11,12</sup>

## **2.8. Efek EGCG terhadap Sistem Imun**

Penelitian pada mencit yang diberikan minuman tambahan 70 mg teh hijau setiap hari selama 4 minggu kemudian diinokulasi dengan *Listeria monocytogenes* intraperitoneal didapatkan peningkatan kemampuan fagositosis makrofag dan peningkatan respons proliferasi limfosit. *Catechin* teh hijau membantu fagositosis dengan cara menghambat kerja enzim hialuronidase bakteri yang dibutuhkan untuk masuk ke dalam sel tubuh.<sup>51</sup>

EGCG memiliki efek imunomodulator seperti menghambat produksi TNF- $\alpha$  yang diinduksi endotoksin<sup>52</sup> dan menghambat angiogenesis pada inflamasi yang diperantarai neutrofil.<sup>53</sup> EGCG mampu mencegah inflamasi dengan cara menghambat enzim elastase leukosit.<sup>54</sup> EGCG juga mampu menurunkan adhesi

monosit pada endotel pembuluh darah.<sup>55</sup> EGCG dapat menstimulasi iodinasi dan produksi IL-1 pada monosit dan sel polimorfonuklear manusia.<sup>56</sup> EGCG mampu menurunkan ekspresi CD11b pada sel T CD8(+) sehingga menghambat infiltrasi sel ini pada daerah inflamasi.<sup>57</sup>

Pada kultur sel mononuklear perifer, pemberian EGCG dapat menstimulasi produksi IL-1 $\alpha$  dan IL-1 $\beta$ .<sup>58</sup> EGCG memiliki efek menurunkan transmigrasi neutrofil melalui *monolayers* sel endotel.<sup>59</sup> EGCG juga mempunyai efek proteksi terhadap radiasi ultraviolet yang menyebabkan imunosupresi dan imunotoleransi, di mana EGCG akan menyebabkan berkurangnya produksi IL-10 dan meningkatnya produksi IL-12 di sel epidermis dan dermis.<sup>60</sup>

Efek EGCG teh hijau sebagai antialergi juga sudah banyak dibuktikan. EGCG secara signifikan terbukti dapat mencegah terjadinya reaksi alergi tipe I.<sup>61</sup> EGCG mempengaruhi fluiditas membran sel mast, sehingga mampu menurunkan pelepasan histamin dari sel mast. Pada penelitian tentang efek inhibisi *catechin* teh hijau terhadap histamin pada sel yang diinduksi antigen IgE ditemukan bahwa EGCG mampu menghambat pelepasan histamin sampai 90% pada suspensi *rat basophilic leukemia cells* secara in vitro.<sup>62</sup> EGCG menghambat produksi histamin dengan jalan menghambat aktivitas enzim *histidin decarboxylase* dan menghambat proses degranulasi basofil pada basofil manusia.<sup>63</sup>

EGCG dapat menghambat reaksi *passive cutaneous anaphylaxis* pada tikus. EGCG terbukti mampu menurunkan pelepasan histamin dan menghambat degranulasi sel mast. Efek inhibisi ini terjadi karena EGCG dapat mencegah peningkatan kalsium intrasel yang disebabkan elevasi cAMP intrasel akibat



peningkatan aktivitas *adenylate cyclase* atau inhibisi terhadap *cAMP phosphodiesterase*.<sup>47</sup> EGCG juga menekan ekspresi FcεRI pada sel basofil manusia sehingga dapat meregulasi negatif terhadap aktivasi basofil, sehingga diharapkan mampu menekan respon alergi.<sup>15</sup> EGCG juga mampu menghambat kemotaksis neutrofil secara *in vitro* maupun *in vivo* pada inflamasi alergi pada tikus yang telah disensitisasi dengan ovalbumin. Pada model reaksi alergi ini EGCG bekerja langsung pada neutrofil sehingga menurunkan infiltrasi neutrofil di jaringan yang mengalami inflamasi, bukan secara tidak langsung seperti menurunkan produksi kemokin.<sup>64</sup>

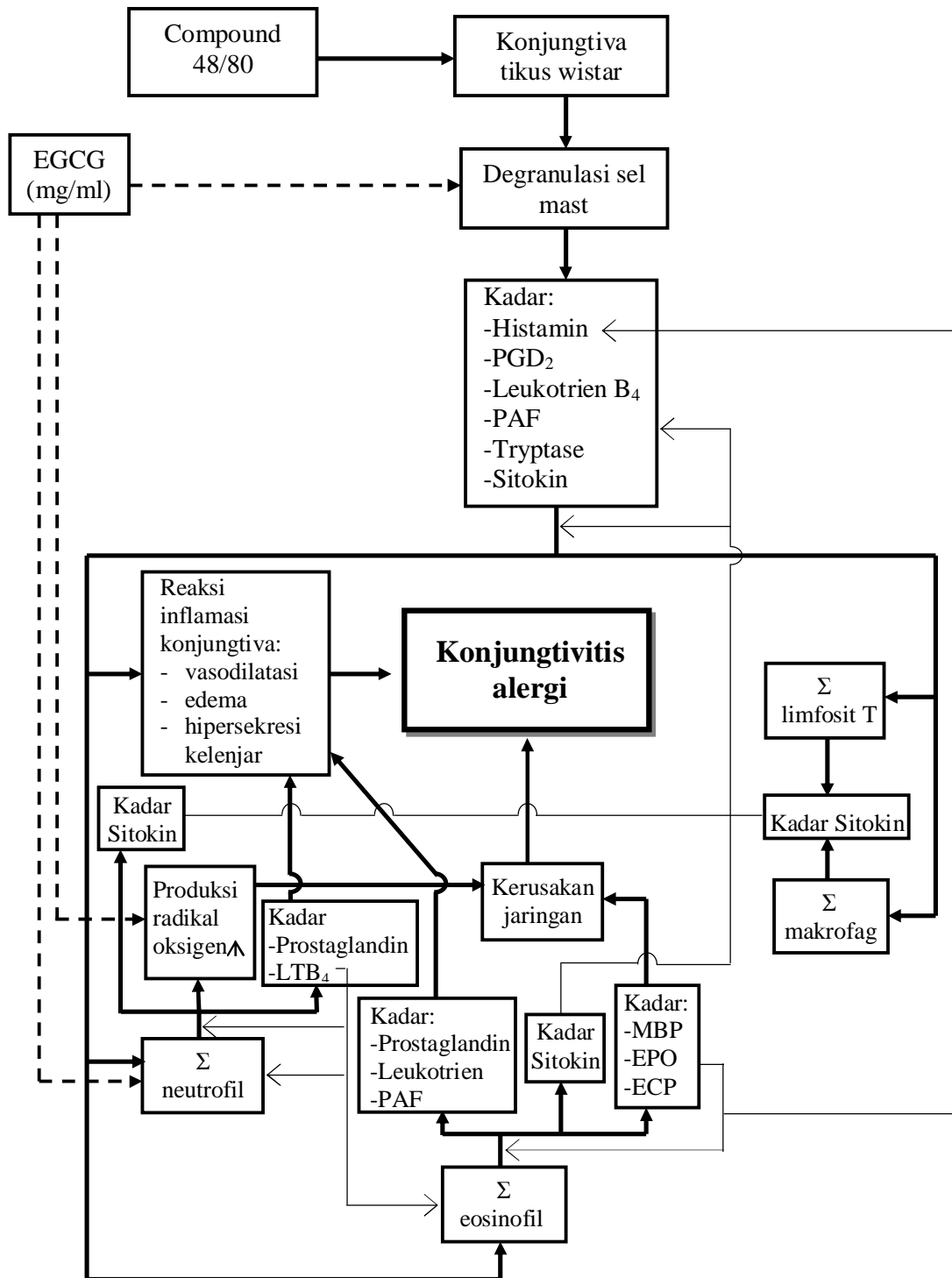
Penghambatan EGCG terhadap proses inflamasi secara *ex vivo* maupun *in vivo* sudah mulai terjadi dalam waktu 1 jam sampai 2 jam pemaparan.<sup>64</sup> Beberapa laporan menyebutkan bahwa potensi penghambatan proses inflamasi EGCG bersifat *dose-dependent* secara *in vitro*, namun secara *in vivo* belum pernah dilaporkan. Kisaran dosis *in vitro* yang pernah dilaporkan dapat menimbulkan penghambatan proses inflamasi adalah  $10^{-3}$  mg/ml sampai  $10^{-1}$  mg/ml atau  $10^{-1}$  μM sampai dengan  $2 \times 10^2$  μM.<sup>14,64,65</sup>

Sejauh ini, penggunaan EGCG sebagai antiinflamasi hanya sebatas penunjang terapi utama. Selain sebagai antioksidan, penggunaan EGCG sebagai terapi pada tingkat klinis masih harus diteliti baik sebagai antiinflamasi, antialergi, antimikroba dan antiproliferatif. Walaupun belum ada hasil penelitian yang menjelaskan efek EGCG pada mata, hasil penelitian efek EGCG yang menyangkut patologi alergi dan anafilaksis secara umum juga dapat menggambarkan patofisiologi alergi pada mata.

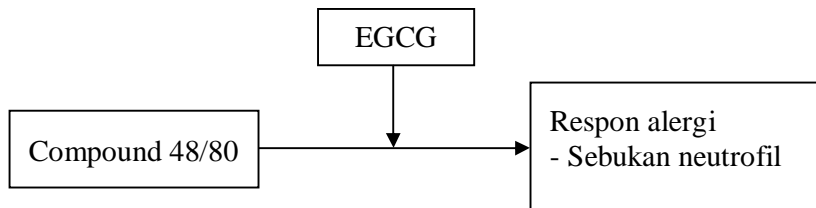
## 2.9. Farmakokinetika Obat Tetes Mata

Sebagian besar bentuk sediaan obat mata adalah tetes mata. Kelebihan bentuk sediaan topikal ini adalah tercapainya konsentrasi obat yang adekuat di segmen depan mata tanpa terjadi efek yang tidak diinginkan di sistem tubuh lainnya. Namun sifat bentuk sediaan tetes mata ini mempunyai keterbatasan yang mempengaruhi efektifitasnya yaitu dalam hal waktu dan volume kontak obat dengan permukaan bola mata. Hanya sekitar 20% saja dari sejumlah obat yang ditetaskan dapat tertahan oleh kelopak mata dan *cul-de-sac* setelah mata berkedip. Jadi bila sejumlah 50  $\mu$ l (volume 1 tetes obat tetes mata pada umumnya) ditetaskan, hanya sekitar 10  $\mu$ l saja yang tertahan di permukaan bola mata. Selanjutnya terjadi penurunan volume obat di dalam air mata secara cepat kurang lebih 16% per menit pada permukaan mata yang sehat. Penurunan volume obat lebih banyak terjadi pada obat tetes yang merangsang refleks air mata. Pada jenis obat yang absorpsinya lambat, 50% obat dapat tertahan di air mata setelah 4 menit penetasan, namun hanya 17% saja yang tertahan setelah 10 menit penetasan. Obat-obatan yang mempunyai sifat isotonis, bebas iritan, dan mempunyai pH fisiologis ( $\pm 7, 4$ ) tidak mengiritasi permukaan bola mata. Sebaliknya obat-obat yang hiper/hipotonis, mengandung iritan (seperti bahan pengawet), mempunyai pH yang tidak fisiologis, dapat mengiritasi dan merangsang refleks air mata.<sup>23</sup>

## 2.10. Kerangka Teori



## 2.11. Kerangka Konsep



## 2.12. Hipotesis

### 2.12.1. Hipotesis Mayor

EGCG topikal dapat menekan sebulan neutrofil konjungtivitis alergi pada tikus Wistar yang diinduksi *Compound 48/80* topikal.

### 2.12.2. Hipotesis Minor

1. Sebulan neutrofil konjungtivitis alergi pada tikus Wistar yang mendapat EGCG topikal berbagai tingkat dosis lebih rendah dibandingkan dengan yang mendapatkan tetes mata air mata buatan.
2. Sebulan neutrofil konjungtivitis alergi pada tikus Wistar yang mendapat EGCG topikal dosis yang lebih tinggi lebih rendah dibandingkan dengan yang mendapatkan EGCG topikal dosis lebih rendah.

## **BAB 3**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1. Ruang lingkup**

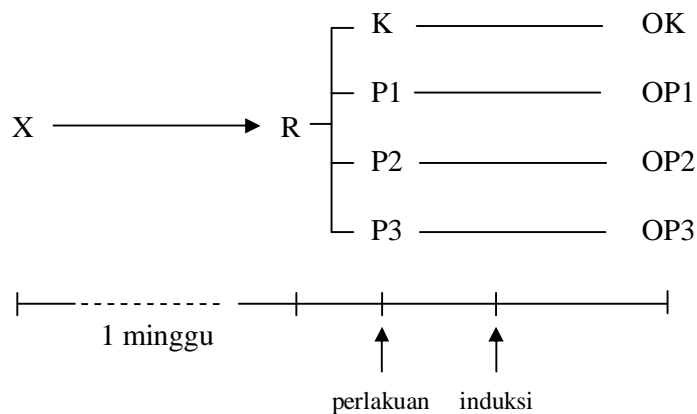
Ruang lingkup penelitian ini adalah Farmakologi, Ilmu Kesehatan Mata, dan Patologi Anatomi.

#### **3.2. Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian akan dilaksanakan di Unit Pemeliharaan Hewan Penelitian Universitas Gadjah Mada Yogyakarta. Pelaksanaan penelitian adalah bulan Maret sampai Juni 2009.

#### **3.3. Jenis dan Rancangan Penelitian**

Penelitian ini merupakan suatu uji eksperimental laboratorium dengan rancangan *post-test only control group design* yang menggunakan binatang percobaan sebagai objek penelitian. Perlakuan adalah dengan pemberian *Compound 48/80* dan berbagai tingkat dosis EGCG pada tikus strain Wistar galur murni. Sedangkan keluarannya berupa sebaran neutrofil pada jaringan konjungtiva yang mengalami konjungtivitis alergi. Hewan percobaan akan dibagi menjadi 4 kelompok



Keterangan :

X → R = Masa aklimatisasi (adaptasi) selama 1 minggu

R = Randomisasi

K = Kontrol, sebagai pembanding, tikus mendapatkan perlakuan tetes mata air mata artifisial dan *Compound 48/80* 250 µg/tetes/mata → Kelompok Kontrol (K)

P1 = Tikus mendapatkan perlakuan tetes mata EGCG 5 x 10<sup>-2</sup> mg/ml dan *Compound 48/80* 250 µg/tetes/mata → Kelompok EGCG Dosis 1

P2 = Tikus mendapatkan perlakuan tetes mata EGCG 5 x 10<sup>-1</sup> mg/ml dan *Compound 48/80* 250 µg/tetes/mata → Kelompok EGCG Dosis 2

P3 = Tikus mendapatkan perlakuan tetes mata EGCG 5 x 10<sup>0</sup> mg/ml dan *Compound 48/80* 250 µg/tetes/mata → Kelompok EGCG Dosis 3

OK = Pengamatan kelompok kontrol K

OP1 = Pengamatan kelompok perlakuan P1

OP2 = Pengamatan kelompok perlakuan P2

OP3 = Pengamatan kelompok perlakuan P3

### **3.4. Sampel Penelitian**

#### **3.4.1. Sampel**

Sampel penelitian adalah tikus strain Wistar galur murni

#### **3.4.2. Cara Pengambilan Sampel**

Kriteria inklusi meliputi :

- a. Tikus betina
- b. Umur 2 – 3 bulan
- c. Berat badan 200 – 300 gram
- d. Tikus tampak aktif
- e. Pada pemeriksaan luar tidak tampak adanya kelainan anatomik khususnya kelainan bola mata

Sedangkan kriteria eksklusi dalam pengambilan sampel adalah tikus mati sebelum tiba waktu terminasi.

#### **3.4.3. Besar Sampel**

Besar sampel ditentukan berdasarkan kriteria WHO yaitu minimal adalah 5 tikus per kelompok. *Drop out* sebanyak 10-20% (1-2 tikus). Sehingga jumlah sampel total untuk kelompok penelitian adalah 24 ekor tikus (24 bola mata).

### **3.5. Variabel Penelitian**

#### **3.5.1. Variabel Bebas**

Variabel bebas adalah jenis perlakuan yang diberikan yaitu:

EGCG dalam berbagai dosis (dosis 1, 2, dan 3).

Skala : rasio

### 3.5.2. Variabel Terikat

Variabel terikat adalah :

Reaksi alergi pada jaringan konjungtiva berupa sebum neutrofil.

Skala : rasio.

### 3.6. Definisi Operasional

III.6.1. Hal yang dilakukan :

#### 3.6.1.1. Perlakuan

Diberikan tetes mata EGCG (*Epigallocatechin-3 Gallate* dari *Sigma Aldrich*, nomor produk E4268), yang terdiri dari beberapa sediaan tetes mata EGCG dengan berbagai tingkat dosis, yaitu  $5 \times 10^{-2}$  mg/ml,  $5 \times 10^{-1}$  mg/ml, dan  $5 \times 10^0$  mg/ml. Pelarut EGCG adalah air mata artifisial Cendo Lyteers® dan pembuatannya dilakukan di *PT. CENDO Pharmaceuticals*, Bandung. Tetes mata EGCG diberikan sebanyak 1 tetes tiap 10 menit selama 1 jam, yang diberikan sebelum induksi alergi dengan *Compound 48/80* (EGCG sebagai *pretreatment*). Tetes mata diberikan pada kedua mata.

#### 3.6.1.2. Induksi alergi

Diberikan tetes mata degranulator sel mast (*Compound 48/80* dari *Sigma Aldrich*, nomor produk C2313) dengan dosis 250 µg/tetes. Pelarut *Compound 48/80* adalah air mata artifisial Cendo Lyteers® dan pembuatannya dilakukan di *PT. CENDO Pharmaceuticals*, Bandung. Tetes mata *Compound 48/80* diberikan sebanyak 1 tetes



pada mata kanan dan kiri 1 jam setelah EGCG *pretreatment* yang pertama diberikan.

#### 3.6.1.3. Kontrol

Diberikan tetes mata air mata artifisial Cendo Lyteers® dan pembuatannya dilakukan di *PT. CENDO Pharmaceuticals*, Bandung.

3.6.2. Sebaran neutrofil pada jaringan konjungtiva yang mengalami konjungtivitis alergi dinilai dengan menggunakan pengecatan rutin *Hematoxylin & Eosin* (H&E).<sup>20</sup> Sebaran neutrofil ini dinilai dengan cara menghitung jumlah neutrofil yang tampak pada pemeriksaan menggunakan mikroskop dengan pembesaran 400 kali. Tiap bola mata dibuat menjadi 6 preparat. Tiap preparat diamati dalam 10 lapangan pandang, yaitu 5 lapangan pandang pada konjungtiva superior dan 5 lapangan pandang pada konjungtiva inferior. Lima lapangan pandang tersebut terdiri dari 2 lapangan pandang pada konjungtiva bulbaris, 2 lapangan pandang pada konjungtiva palpebra, serta 1 lapangan pandang pada konjungtiva fornix. Hasil yang telah didapat kemudian dihitung rata-rata sebaran neutrofil tiap lapangan pandang tiap bola mata.

### 3.7. Alat dan Bahan Penelitian

#### 3.7.1. Alat

- a. 4 buah kandang kelompok hewan coba dan perlengkapan pemeliharaannya di UHP Universitas Gadjah Mada
- b. Timbangan dengan skala gram

- c. Jam dengan penanda waktu menit dan alarm
- d. Speculum mata ukuran terkecil
- e. *Loop S + 3D*
- f. Senter
- g. *Spuut* 1 ml dengan 27G
- h. Set eksenterasi ukuran kecil
- i. Set pemeriksaan histopatologi dan pengecatan H&E
- j. Mikroskop dengan fasilitas kamera digital
- k. Mikrometer untuk lensa okuler pada mikroskop

### **3.7.2. Bahan dan Materi**

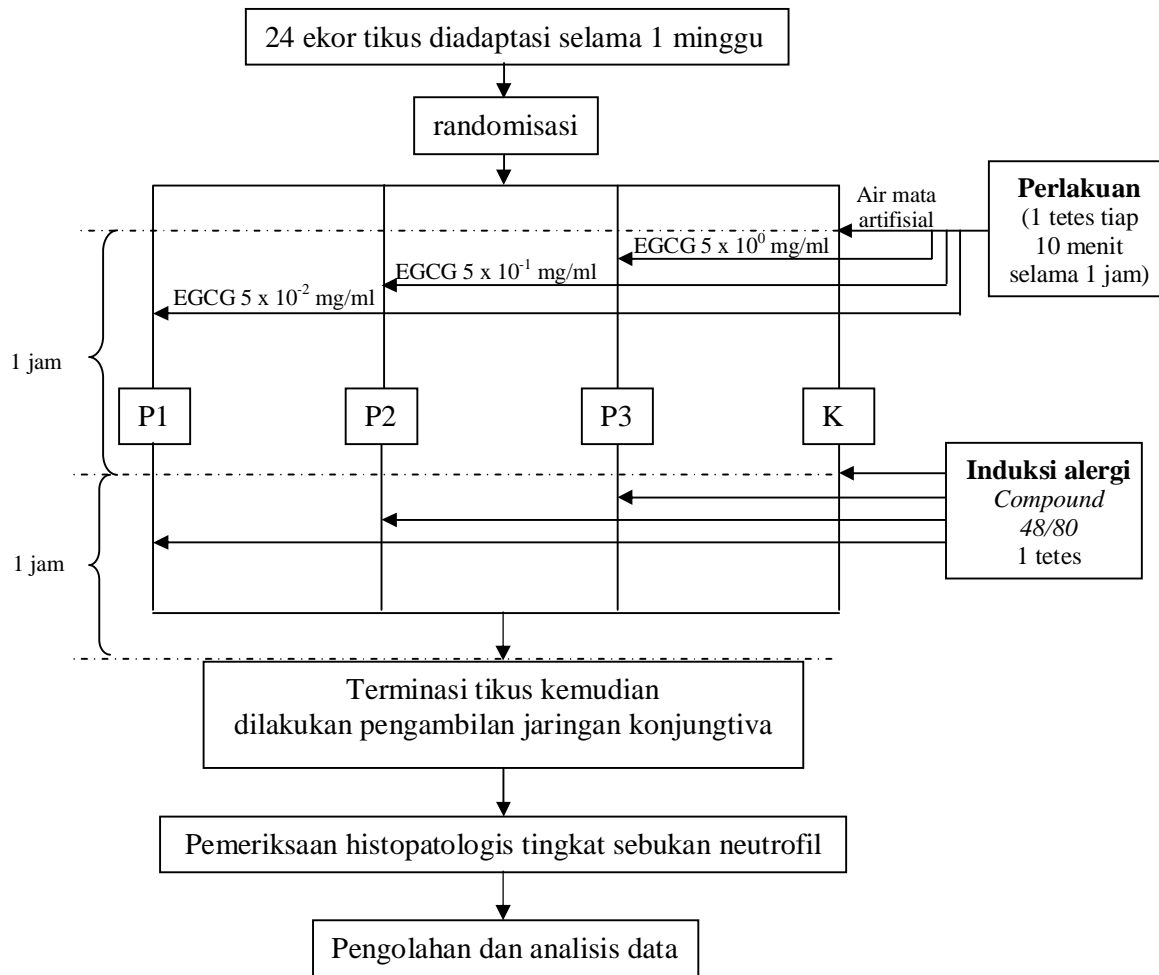
- a. Tikus strain Wistar berkelamin betina usia 2 – 3 bulan atau mempunyai berat badan 200 – 300 gram yang dikembangkan dan dipelihara di UPHP Universitas Gadjah Mada Yogyakarta
- b. Tetes mata EGCG (*Sigma Aldrich*, nomor produk E4268) dengan berbagai tingkat dosis, yaitu  $5 \times 10^{-2}$  mg/ml,  $5 \times 10^{-1}$  mg/ml, dan  $5 \times 10^0$  mg/ml
- c. Tetes mata Compound 48/80 (*Sigma Aldrich*, nomor produk C2313) dengan dosis 250 µg/tetes
- d. Tetes mata air mata artifisial Cendo Lyteers®
- e. *Buffer* formalin 10%

### 3.8. Cara Kerja

1. Sebanyak total 24 ekor tikus strain wistar sesuai kriteria sampel diaklimatisasi di dalam 4 kelompok kandang dan lingkungan yang sama, diberi pakan standar yang sama secara *ad libitum* selama satu minggu.
2. Setelah itu 24 ekor tikus tersebut dibagi menjadi 4 kelompok perlakuan masing-masing kelompok 6 ekor tikus.
  - a. Kelompok Kontrol (K) mendapatkan perlakuan tetes mata air mata artifisial 1 tetes/mata setiap 10 menit selama 1 jam dan tetes mata *Compound 48/80* 250 µg/mata 1 tetes segera setelahnya.
  - b. Kelompok EGCG Dosis 1 (P1) mendapatkan perlakuan tetes mata EGCG  $5 \times 10^{-2}$  mg/ml 1 tetes setiap 10 menit selama 1 jam dan tetes mata *Compound 48/80* 250 µg/mata 1 tetes segera setelahnya.
  - c. Kelompok EGCG Dosis 2 (P2) mendapatkan perlakuan tetes mata EGCG  $5 \times 10^{-1}$  mg/ml 1 tetes setiap 10 menit selama 1 jam dan tetes mata *Compound 48/80* 250 µg/mata 1 tetes segera setelahnya.
  - d. Kelompok EGCG Dosis 3 (P3) mendapatkan perlakuan tetes mata EGCG  $5 \times 10^0$  mg/ml 1 tetes setiap 10 menit selama 1 jam dan tetes mata *Compound 48/80* 250 µg/mata 1 tetes segera setelahnya.
3. Masing-masing kelompok, setelah 1 jam pemberian tetes mata *Compound 48/80*, dilakukan pengambilan jaringan konjungtiva.
4. Prosedur pengambilan jaringan konjungtiva adalah sebagai berikut :
  - a. Tikus diterminasi
  - b. Dilakukan eksenterasi pada mata tikus sesaat setelah terminasi

- c. Bola mata yang sudah terlepas dimasukkan ke dalam cairan fiksasi yaitu *buffer* formalin 10%
5. Kualitas data penelitian juga dikontrol melalui perawatan hewan coba sebagai berikut :
- a. Tikus akan ditempatkan pada kandang khusus, di mana setiap kandang berisi maksimal 10 ekor tikus
  - b. Kandang hewan coba akan dibersihkan secara teratur dengan frekuensi serta kebersihan yang sama
  - c. Kandang hewan coba akan mendapat ventilasi dan pencahayaan yang memadai dan kualitasnya sama untuk setiap kandang
  - d. Pakan dan air minum diberikan secara *ad libitum*. Jenis pakan adalah pakan standar tikus berupa pelet.
6. Apabila dijumpai tikus yang luka pada bola mata ataupun mati maka tikus akan dikeluarkan dari penelitian dan akan diganti tikus baru. Perlakuan untuk tikus pengganti akan dilakukan sama seperti kelompok yang sesuai.

### 3.9. Alur Penelitian



### 3.10. Analisis Data

Data hasil penelitian akan diolah dan disajikan dalam bentuk tabel dan grafik. Pertama-tama akan dilakukan uji normalitas data menggunakan uji *Kolmogorov-Smirnov*. Bila distribusi datanya normal, maka untuk menguji perbedaan tingkat sebuman neutrofil pada jaringan konjungtiva yang mengalami konjungtivitis alergi pada seluruh kelompok perlakuan digunakan uji *One-Way*

*ANOVA* dan untuk melihat perbedaan masing-masing kelompok perlakuan digunakan uji *Post Hoc (Bonferroni)*.

Sedangkan bila distribusi datanya tidak normal, maka untuk menguji perbedaan tingkat sebum neutrofil pada jaringan konjungtiva yang mengalami konjungtivitis alergi pada seluruh kelompok perlakuan digunakan uji *Kruskal-Wallis* dan untuk melihat perbedaan masing-masing kelompok perlakuan digunakan uji *Mann-Whitney U*.

Semua analisis statistik tersebut dilakukan dengan menggunakan program komputer *SPSS*. Nilai signifikansi penelitian ini adalah apabila variabel yang dianalisis memiliki nilai  $p < 0,05$ .

## BAB 4

### HASIL PENELITIAN

#### 4.1. Analisis Sampel

Sampel penelitian tiap kelompok perlakuan tidak mengalami pengurangan jumlah. Sampel penelitian tiap kelompok perlakuan tetap berjumlah 6 ekor tikus Wistar, sehingga besar sampel keseluruhan tetap berjumlah 24 ekor tikus (24 bola mata).

#### 4.2. Analisis Deskriptif

Hasil penilaian sebulan neutrofil konjungtivitis alergi pada tikus Wistar kelompok kontrol dan perlakuan adalah sebagai berikut:

**Tabel 1.** Rerata sebulan neutrofil konjungtivitis alergi pada tikus Wistar  
tiap kelompok perlakuan

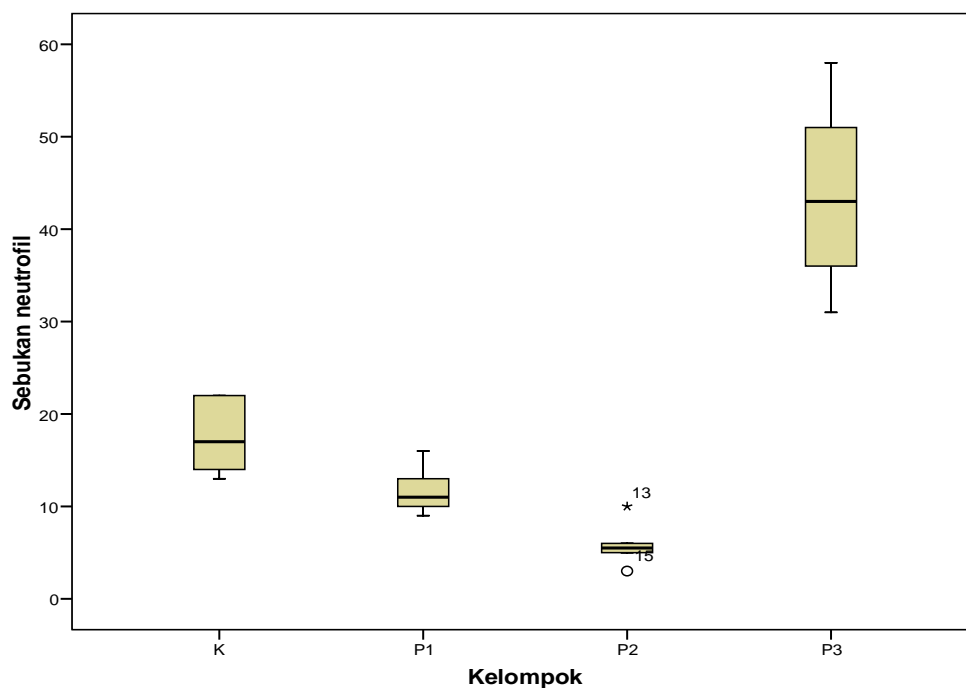
Kelompok	n	<i>Mean</i> $\pm$ SD	Minimal	Maksimal
K	6	17,50 $\pm$ 3,83	13	22
P1	6	11,67 $\pm$ 2,50	9	16
P2	6	5,83 $\pm$ 2,32	3	10
P3	6	43,67 $\pm$ 9,81	31	58

Rerata sebulan neutrofil yang tertinggi didapatkan pada kelompok EGCG dosis 5 x 10<sup>0</sup> mg/ml (P3), kemudian secara berurutan diikuti oleh kelompok

kontrol (K), kelompok EGCG dosis  $5 \times 10^{-2}$  mg/ml (P1), dan kelompok EGCG dosis  $5 \times 10^{-1}$  mg/ml (P2) yang terendah.

#### 4.3. Analisis Inferensial

Gambaran perbedaan sebulan neutrofil antara keempat kelompok dapat dilihat dengan grafik *Box-plot* (Gambar 1)



**Gambar 1.** Grafik *Box-plot* sebulan neutrofil konjungtivitis alergi pada tikus Wistar tiap kelompok perlakuan

Hasil uji *Kolmogorov-Smirnov* menunjukkan bahwa data yang diperoleh memiliki distribusi yang normal ( $p > 0,05$ ). Kemudian dilakukan uji homogenitas varians menggunakan uji *Leuvene test of varians*. Hasilnya menunjukkan bahwa data yang diperoleh memiliki varians yang tidak sama ( $p < 0,05$ ), sehingga dilakukan usaha untuk menyamakan varians dengan melakukan transformasi data



sesuai *slope* dan *power* data tersebut yaitu menggunakan logaritma. Data hasil transformasi kemudian diuji kembali dan didapatkan bahwa data memiliki varians yang sama ( $p > 0,05$ ), sehingga dilakukan uji *One-Way ANOVA*.

Pada uji *One-Way ANOVA* didapatkan  $p = 0,000$  yang menunjukkan bahwa ada perbedaan sebaran neutrofil pada jaringan konjungtiva yang bermakna pada seluruh kelompok perlakuan ( $p < 0,05$ ).

Hasil uji statistik lanjutan menggunakan uji *Post Hoc (Bonferroni)* menunjukkan nilai  $p$  seperti yang dapat dilihat pada tabel berikut ini:

**Tabel 2.** Nilai perbandingan hasil uji *Post Hoc (Bonferroni)* terhadap sebaran neutrofil konjungtivitis alergi pada tikus Wistar antar kelompok perlakuan

	K	P1	P2	P3
K	-	0,107	0,000	0,000
P1	0,107	-	0,001	0,000
P2	0,000	0,001	-	0,000
P3	0,000	0,000	0,000	-

Pada uji *Post Hoc (Bonferroni)* terhadap sebaran neutrofil jaringan konjungtiva antara kelompok yang hanya diinduksi *Compound 48/80* (K) dengan kelompok yang diinduksi *Compound 48/80* dan diberi EGCG berbagai tingkat dosis (P1, P2, P3) didapatkan: K-P1  $p = 0,107$ ; K-P2  $p = 0,000$ ; K-P3  $p = 0,000$ . Hal ini menunjukkan bahwa antara kelompok yang hanya diinduksi *Compound 48/80* (K) dengan kelompok yang diberi EGCG  $5 \times 10^{-2}$  mg/ml sebelum induksi *Compound 48/80* (P1) tidak didapatkan perbedaan yang bermakna, sedangkan

antara K dengan kelompok yang diberi EGCG  $5 \times 10^{-1}$  mg/ml (P2) atau EGCG  $5 \times 10^0$  mg/ml (P3) sebelum induksi *Compound 48/80* didapatkan perbedaan yang bermakna.

Pada uji *Post Hoc (Bonferroni)* terhadap sebaran neutrofil jaringan konjungtiva antara kelompok P1, P2 dan P3 didapatkan: P1-P2  $p = 0,001$ ; P1-P3  $p = 0,000$ ; P2-P3  $p = 0,000$ . Hasil ini menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna antara kelompok-kelompok tersebut.

## BAB 5

### PEMBAHASAN

Konjungtivitis alergi merupakan salah satu bentuk manifestasi respon imun spesifik terhadap suatu antigen yang disebut alergen, di mana alergen tersebut akan terikat pada IgE di permukaan sel mast, dan menginduksi suatu respon akut yang diperantarai sel mast. Sel mast akan mengalami degranulasi, sehingga mengeluarkan mediator-mediator yang akan mengakibatkan gejala seperti gatal, mata merah berair, dan bengkak, namun tidak sakit.<sup>8</sup> Tahap ini disebut reaksi fase cepat. Setelah itu akan terjadi reaksi fase lambat setelah 4-24 jam, yang ditandai dengan infiltrasi eosinofil, neutrofil, limfosit, dan makrofag, di mana sel-sel ini akan mengamplifikasi inflamasi yang terjadi.<sup>9,10</sup> Pada reaksi fase lambat ini, infiltrasi leukosit yang dominan pada jaringan konjungtiva adalah eosinofil dan neutrofil.<sup>10</sup>

*Compound 48/80* adalah suatu bahan dapat menginduksi degranulasi sel mast dan melepaskan mediator histamin.<sup>16</sup> Aplikasi secara topikal *Compound 48/80* dengan dosis 250 µg pada mata tikus mampu menimbulkan perubahan secara klinis maupun histopatologi yang menyerupai konjungtivitis alergi pada manusia.<sup>17,18</sup> Secara klinis nampak adanya iritasi pada konjungtiva, eritema, *chemosis*, dan adanya *discharge*. Pemeriksaan histopatologis menunjukkan infiltrasi neutrofil yang dominan, selain ditemukan pula makrofag, limfosit T CD4+, dan sejumlah kecil eosinofil.<sup>19,20</sup>

EGCG *pretreatment* mampu mencegah reaksi alergi dengan cara menurunkan produksi dan pelepasan histamin, menghambat degranulasi sel mast, serta menurunkan infiltrasi neutrofil pada jaringan yang mengalami inflamasi akibat reaksi alergi.<sup>47,62-64</sup>

Jaringan konjungtiva yang mengalami konjungtivitis alergi pada kelompok yang diberi EGCG  $5 \times 10^{-2}$  mg/ml (P1) dibandingkan kelompok kontrol (K) menunjukkan adanya penurunan sebaran neutrofil yang tidak bermakna (Gambar 2 dan 3). Kelompok yang diberi EGCG  $5 \times 10^{-1}$  mg/ml (P2) menunjukkan adanya penurunan sebaran neutrofil yang bermakna dibandingkan dengan kelompok kontrol (K) (Gambar 2 dan 3). Hal ini menunjukkan bahwa dosis EGCG sebesar  $5 \times 10^{-2}$  mg/ml belum cukup untuk menurunkan sebaran neutrofil secara bermakna, sedangkan dosis EGCG sebesar  $5 \times 10^{-1}$  mg/ml adekuat untuk menurunkan sebaran neutrofil secara bermakna pada jaringan konjungtiva yang mengalami konjungtivitis alergi. Hasil uji beda antara kelompok P1 dengan P2 menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna. Hal ini menunjukkan bahwa sebaran neutrofil jaringan konjungtiva yang mengalami konjungtivitis alergi akan semakin rendah jika dosis EGCG yang diberikan ditambah, yaitu dari dosis  $5 \times 10^{-2}$  mg/ml menjadi  $5 \times 10^{-1}$  mg/ml.

Hasil di atas sejalan dengan beberapa penelitian sebelumnya yang menyatakan penghambatan EGCG terhadap proses inflamasi secara *ex vivo* maupun *in vivo* sudah mulai terjadi dalam waktu 1 jam sampai 2 jam pemaparan.<sup>64</sup> Hasil di atas juga sejalan dengan beberapa laporan yang menyebutkan bahwa potensi penghambatan proses inflamasi oleh EGCG pada

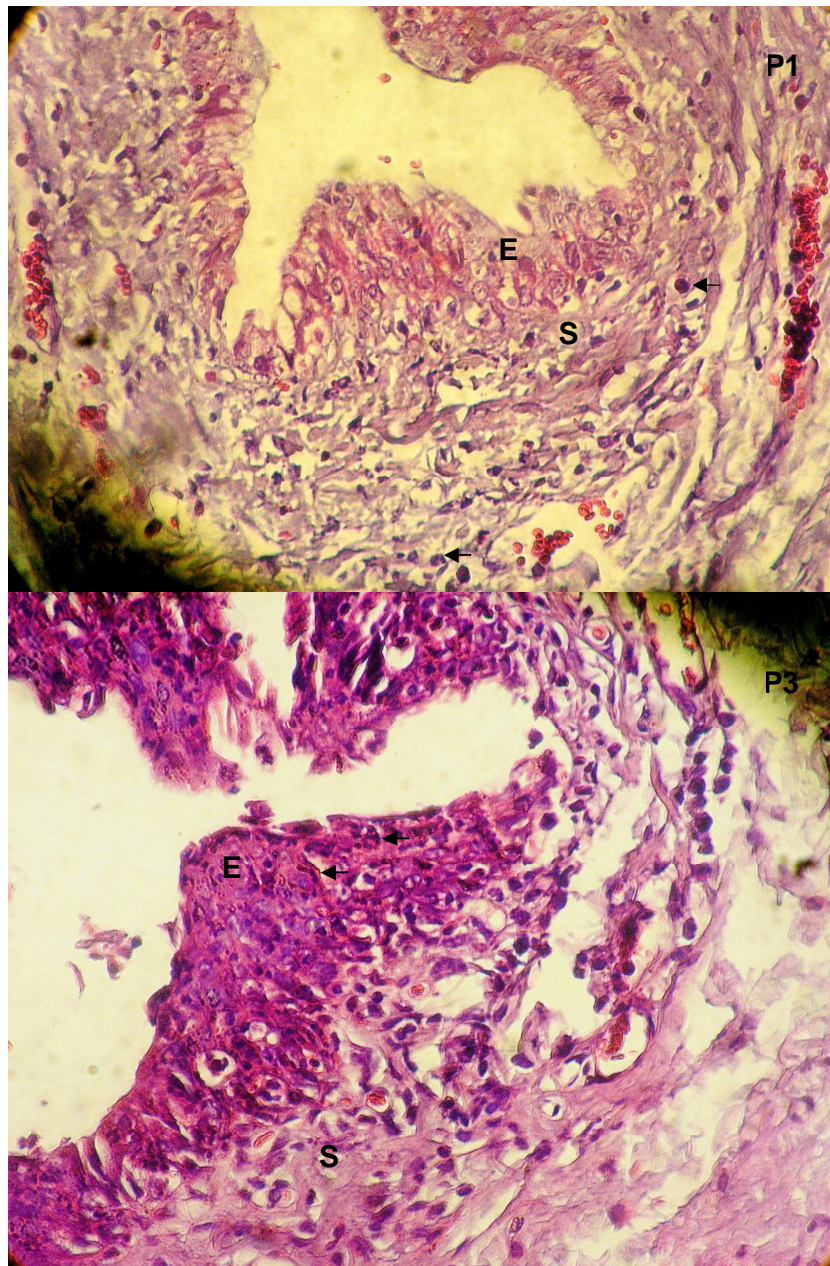
kisaran dosis tertentu bersifat *dose-dependent* secara *in vitro*. Kisaran dosis *in vitro* yang pernah dilaporkan dapat menimbulkan penghambatan proses inflamasi adalah  $10^{-3}$  mg/ml sampai  $10^{-1}$  mg/ml atau  $10^{-1}$   $\mu$ M sampai dengan  $2 \times 10^2$   $\mu$ M.<sup>14,64,65</sup> Penelitian ini menggunakan kisaran dosis EGCG berdasarkan dosis *in vitro* yang mampu menghambat proses inflamasi, kemudian dosis tersebut dinaikkan. Hal ini dilakukan karena belum ada laporan mengenai dosis *in vivo* EGCG topikal yang dapat digunakan. Dosis tertentu EGCG topikal, serta kenaikannya pada tingkat tertentu nampaknya akan semakin menghambat proses inflamasi pada konjungtivitis alergi, karena sebaran neutrofil pada jaringan konjungtiva menurun oleh pemberian EGCG tersebut.

EGCG secara signifikan terbukti dapat mencegah terjadinya reaksi alergi tipe I.<sup>61</sup> EGCG teh hijau memiliki efek sebagai antialergi melalui beberapa mekanisme. EGCG menekan ekspresi Fc $\epsilon$ RI pada sel basofil sehingga dapat meregulasi negatif terhadap aktivasi basofil. Hambatan terhadap aktivasi basofil ini diharapkan mampu menekan respon alergi.<sup>15</sup> EGCG juga mempengaruhi fluiditas membran sel mast, sehingga mampu menurunkan pelepasan histamin dari sel mast.<sup>62</sup> EGCG menghambat produksi histamin dengan jalan menghambat aktivitas enzim *histidin decarboxylase* dan menghambat proses degranulasi basofil pada basofil manusia.<sup>63</sup>

EGCG terbukti mampu menurunkan pelepasan histamin dan menghambat degranulasi sel mast. Efek inhibisi ini terjadi karena EGCG dapat mencegah peningkatan kalsium intrasel yang disebabkan elevasi cAMP intrasel akibat peningkatan aktivitas *adenylate cyclase* atau inhibisi terhadap cAMP

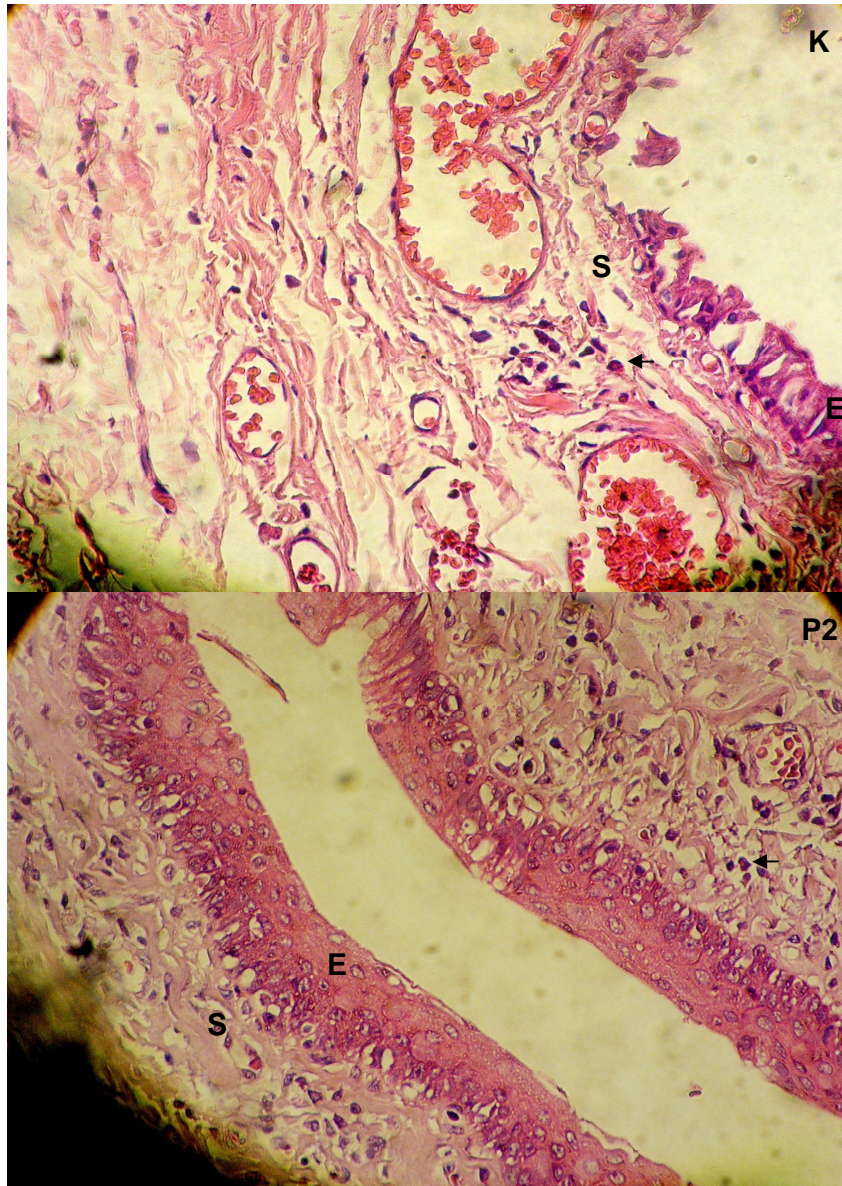
*phosphodiesterase*.<sup>47</sup> Penurunan produksi dan pelepasan histamin, serta hambatan terhadap degranulasi sel mast dan basofil oleh EGCG nampaknya mampu menurunkan pelepasan mediator-mediator inflamasi dari sel-sel tersebut yang pada akhirnya akan menghambat reaksi radang pada konjungtivitis alergi, serta menurunkan infiltrasi neutrofil dan leukosit lain pada jaringan konjungtiva yang mengalami konjungtivitis alergi tersebut.

EGCG memiliki efek menurunkan transmigrasi neutrofil melalui *monolayers* sel endotel.<sup>59</sup> EGCG juga mampu menghambat kemotaksis neutrofil secara *in vitro* maupun *in vivo* pada inflamasi akibat alergi, dalam hal ini EGCG bekerja langsung pada neutrofil sehingga menurunkan infiltrasi neutrofil di jaringan yang mengalami inflamasi.<sup>64</sup> Kedua efek EGCG ini kemungkinan besar juga berperan dalam menurunkan sebaran neutrofil pada jaringan konjungtiva yang mengalami konjungtivitis alergi.



**Gambar 2.** Gambaran histopatologis konjungtiva tikus Wistar dengan pemberian EGCG  $5 \times 10^{-2}$  mg/ml (**P1**) dan  $5 \times 10^0$  mg/ml (**P3**). Sebaran neutrofil pada epitel (**E**) dan stroma konjungtiva (**S**) yang tertinggi terdapat pada **P3** lalu diikuti **K**, **P1**, dan **P2** secara berurutan (Gambar 4). Neutrofil ( $\blackleftarrow$ ). Perbesaran 400X





**Gambar 3.** Gambaran histopatologis konjungtiva tikus Wistar dengan pemberian air mata artifisial (**K**) dan EGCG  $5 \times 10^{-1}$  mg/ml (**P2**). Epitel (**E**), stroma konjungtiva (**S**), neutrofil ( $\blackleftarrow$ ). Perbesaran 400X



Kelompok yang diberi EGCG  $5 \times 10^0$  mg/ml (P3) menunjukkan adanya peningkatan sebaran neutrofil yang bermakna pada jaringan konjungtiva dibandingkan kelompok kontrol (K), begitu pula jika dibandingkan dengan kelompok P1 dan P2 (Gambar 2 dan 3). Hal ini menunjukkan bahwa EGCG pada dosis  $5 \times 10^0$  mg/ml kemungkinan besar dapat menimbulkan reaksi inflamasi pada konjungtiva. Infiltrasi neutrofil dapat ditemukan pada reaksi inflamasi atau iritasi terhadap jaringan konjungtiva yang disebabkan oleh bahan tertentu. Bahan tersebut dapat bersifat iritatif atau bahkan toksik saat mengenai mata secara langsung.<sup>66,67</sup> Hasil penelitian Stratton dkk (2000) tidak menemukan adanya efek toksik lokal pada kulit mencit strain BALB/c dan SKH1 yang diolesi salep EGCG dengan dosis bertingkat 1-10%, namun belum ada laporan mengenai efek toksik EGCG lokal pada mata.<sup>68</sup>

Kelemahan penelitian ini yaitu menggunakan tikus, sehingga sulit digeneralisasikan pada manusia, walaupun berbagai penelitian yang dilakukan menggunakan model konjungtivitis alergi dan konjungtivitis akut pada tikus strain Wistar menunjukkan bahwa strain tersebut memiliki respons imunologis yang adekuat.<sup>27</sup> Kisaran dosis EGCG yang digunakan pada penelitian ini tidak terlalu rinci, karena selisih atau jarak antara dosis EGCG yang satu dengan yang lain cukup besar. Dosis EGCG yang digunakan pada penelitian ini ditentukan dengan perkiraan berdasarkan dosis *in vitro* yang mampu menghambat inflamasi, karena memang belum ada laporan mengenai penggunaan EGCG topikal pada mata.

## BAB 6

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 6.1. Kesimpulan

Pemberian EGCG topikal pada dosis tertentu ( $5 \times 10^{-1}$  mg/ml) mampu menekan sebaran neutrofil konjungtivitis alergi pada tikus Wistar yang diinduksi dengan *Compound 48/80* topikal secara signifikan, sedangkan EGCG topikal pada dosis yang lebih rendah ( $5 \times 10^{-2}$  mg/ml) tidak mampu menekan sebaran neutrofil konjungtivitis alergi pada tikus Wistar yang diinduksi dengan *Compound 48/80* topikal secara signifikan.

Peningkatan dosis EGCG topikal dari dosis yang rendah ( $5 \times 10^{-2}$  mg/ml) ke dosis tertentu ( $5 \times 10^{-1}$  mg/ml) akan semakin menekan sebaran neutrofil konjungtivitis alergi pada tikus Wistar yang diinduksi dengan *Compound 48/80* topikal secara signifikan.

Pemberian EGCG topikal pada dosis yang lebih tinggi ( $5 \times 10^0$  mg/ml) meningkatkan sebaran neutrofil konjungtivitis alergi pada tikus Wistar yang diinduksi dengan *Compound 48/80* topikal, jika dibandingkan dengan EGCG dosis yang lebih rendah maupun yang tidak mendapatkan EGCG. EGCG pada dosis yang lebih tinggi ini kemungkinan besar menimbulkan iritasi dan reaksi inflamasi pada konjungtiva tikus Wistar.

Rerata sebaran neutrofil konjungtivitis alergi pada kelompok yang mendapat tetes mata air mata buatan adalah 17,50, pada kelompok yang mendapat dosis EGCG topikal terendah ( $5 \times 10^{-2}$  mg/ml) adalah 11,67, pada kelompok yang

mendapat dosis EGCG topikal yang lebih tinggi ( $5 \times 10^{-1}$  mg/ml) adalah 5,83, dan pada kelompok yang mendapat dosis EGCG topikal tertinggi ( $5 \times 10^0$  mg/ml) adalah 43,67.

Rerata sebulan neutrofil yang tertinggi didapatkan pada kelompok yang mendapat EGCG dosis terbesar ( $5 \times 10^0$  mg/ml), kemudian secara berurutan diikuti oleh kelompok yang mendapat tetes mata air mata buatan, kelompok EGCG dosis terendah ( $5 \times 10^{-2}$  mg/ml), dan kelompok EGCG dosis  $5 \times 10^{-1}$  mg/ml.

## **6.2. Saran**

1. Penelitian lebih lanjut untuk mengetahui dosis optimal EGCG topikal yang mampu menekan sebulan neutrofil konjungtivitis alergi perlu dilakukan dengan menggunakan dosis bertingkat dalam kisaran dosis yang lebih rinci.
2. Penelitian mengenai uji toksisitas lokal EGCG topikal terhadap mata, khususnya pada jaringan konjungtiva perlu dilakukan.
3. Penelitian lebih lanjut untuk mengetahui efek EGCG terhadap sel lain dan mediator-mediator inflamasi perlu dilakukan karena kesemuanya ikut berperan dalam patogenesis konjungtivitis alergi.
4. Penelitian untuk mengetahui efek antialergi EGCG topikal terhadap gambaran klinis konjungtivitis alergi pada hewan coba perlu dilakukan.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Howarth PH. Is allergy increasing? Early life influences. *Clin Exp Allergy* 1998; 28: 2-7
2. Ray NF, Baraniuk JN, Thamer M, Rinehart CS, Gergen PJ, Kaliner M et al. Direct expenditures for the treatment of allergic rhinoconjunctivitis in 1996, including the contributions of related airway illnesses. *J Allergy Clin Immunol* 1999;103:401–407
3. Dinowitz M, Rescigno R, Bielory L. Ocular allergic diseases: differential diagnosis, examination techniques, and testing. *Clin Allergy Immunol* 2000;15:127–150
4. Bielory L. Allergic and immunologic disorders of the eye. Part II: ocular allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2000;106:1019–1032
5. Schmid KL, Schmid LM. Ocular allergy: causes and therapeutic options. *Clin Exp Optom* 2000; 83: 5: 257–270
6. Sanico AM, Bochner BS, Saini SS. Immediate hypersensitivity: approach to diagnosis. In: Adelman DC, Casale TB, Corren J, editors. *Manual of allergy and immunology: diagnosis and therapy*. 4<sup>th</sup> edition. Lippincott Williams & Wilkins Publisher, 2002: 8
7. Juniper EF, Guyatt GH, Dolovich J. Assessment of quality of life in adolescents with allergic rhinoconjunctivitis: development and testing of a questionnaire for clinical trials. *J Allergy Clin Immunol* 1994;93:413–423
8. Abbas AK. Diseases of immunity. In: Kumar V, Abbas AK, Fausto N, editors. *Pathologic basis of disease*. 7<sup>th</sup> edition. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2005 : 194, 208
9. Miyazaki D, Tominaga T, Yakura K, Kuo CH, Komatsu N, Inoue Y, et al. Conjunctival mast cell as a mediator of eosinophilic response in ocular allergy. *Mol Vis* 2008; 14: 1525–1532
10. Meyer D. Current concepts in the therapeutic approach to allergic conjunctivitis. *Current Allergy & Clinical Immunology* 2006; 19(2): 65-68

11. (-)- Epigallocatechin gallate [Online]. [cited 2009 Jan 11]; Available from:  
URL: [http://www.chemicaland21.com/lifescience/foco/\(-\)-EPIGALLOCATECHIN%20GALLATE.htm](http://www.chemicaland21.com/lifescience/foco/(-)-EPIGALLOCATECHIN%20GALLATE.htm)
12. Ben B. Phytochemicals as nutraceuticals. [Online]. [cited 2009 Jan 11]; Available from: URL:  
<http://www.benbest.com/nutrceut/phytochemicals.html#contents>
13. Lin YL, Lin JK. (-)-Epigallocatechin-3-gallate blocks the induction of nitric oxide synthase by down-regulating lipopolysaccharide-induced activity of transcription factor nuclear factor- $\kappa$ B. *Molecular Pharmacology* 1997; 52: 465-472
14. Xiu-zu S, Zhi-gang BI, Ai-e X. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate inhibits the expression of nitric oxide synthase and generation of nitric oxide induced by ultraviolet B in HaCaT cells. *Chinese Medical Journal* 2006; 119(4): 282-287
15. Fujimura Y, Tachibana H, Yamamoto MM, Miyase T, Sano M, Yamada K. Antiallergic Tea Catechin, (-)-Epigallocatechin-3-*O*-(3-*O*-methyl)-gallate, Suppresses Fc $\epsilon$ RI Expression in Human Basophilic KU812 Cells. *J Agric Food Chem* 2002; 50(20): 5729-5734
16. Koibuchi Y, et al. Histamine release induced from mast cell by active components of compound 48/80. *Eur J Pharmacol* 1985; 115: 163-70
17. Allansmith MR, Baird RS, Ross RN, Barney NP, Bloch KJ. Ocular anaphylaxis induced in the rat by topical application of compound 48/80. Dose response and time course study. *Acta Ophthalmol Suppl* 1989;192: 145–153
18. Tiligada E, Aslanis D, Delitheos A, Varonos D. Changes in histamine content following pharmacologically induced mast cell degranulation in the rat conjunctiva. *Pharmacol Res* 2000; 41: 667-670
19. Li Q, Luyo D, Hikita N, Whitcup SM, Chan C-C. Compound 48/80-induced conjunctivitis in the mouse : kinetics, susceptibility, and mechanism. *International archives of allergy and immunology* 1996; 109(3): 277-285

20. Whitcup SM., Chan C-C, Luyo D, Bo P, Li Q. Topical cyclosporine inhibits mast cell-mediated conjunctivitis. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 1996; 37(13): 2686-2693
21. Riordan-eva P. Anatomi dan embriologi mata. Dalam: Vaughan DG, Asbury T, Riordan-eva P, editor. *Oftalmologi umum*. Edisi 14. Alih bahasa: Tambajong J, Pendit BU. Jakarta: Widya Medika, 2000: 5,6
22. Spencer WH, Zimmerman LE. Conjunctiva. In: Spence WH, editor. *Ophthalmic pathology an atlas and textbook*. Vol.1. 3<sup>rd</sup> edition. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1985: 109-16, 128-50
23. Liesegang TJ, Deutsch TA, Grand MG, editors. Basic and clinical science course, fundamentals and principles of ophthalmology, section 2, 2001-2002. The Foundation of the American Academy of Ophthalmology. San Francisco, 2001: 37-9, 45-51, 302-10, 387-93
24. Tsubota K, Tseng SCG, Nordlund ML. Anatomy and physiology of the ocular surface. In: Holland EJ, Mannis MJ, editors. *Ocular surface disease*. New York: Springer-Verlag, 2002:3-15
25. Liesegang TJ, Deutsch TA, Grand MG, editors. Basic and clinical science course, intraocular inflammation and uveitis, section 9, 2001-2002. The Foundation of the American Academy of Ophthalmology. San Francisco, 2001: 72
26. Setzer PY, Nichols BA, Dawson CR. Unusual structure of rat conjunctival epithelium, light and electron microscopy . *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1987; 27:531-537
27. Groneberg DA, Bielory L, Fischer DA, Bonini S, Wahn U. Animal models of allergic and inflammatory conjunctivitis. *Allergy* 2003; 58:1101-13
28. Underwood JCE. Immunologi dan imunopatologi. Dalam: *Patologi umum dan sistematik*. Edisi 2. Volume 1. Edisi Bahasa Indonesia. Sarjadi, editor. Jakarta: EGC, 1999: 200
29. Kircher S, Marquardt D. Introduction to the immune system. In: Adelman DC, Casale TB, Corren J, editors. *Manual of allergy and immunology*:

- diagnosis and therapy. 4<sup>th</sup> edition. Lippincott Williams & Wilkins Publisher, 2002: 7
30. Cruse JM, Lewis RE. Types I, II, III, and IV hypersensitivity. In: Atlas of immunology. Second edition. CRC Press LLC, 2004: 340-370
  31. Wills-Karp M, Hershey GK. Immunological mechanisms of allergic disorders. In: Paul WE, editor. Fundamental immunology. 5<sup>th</sup> edition. Lippincott Williams & Wilkins Publishers, 2003: 54
  32. Janeway AC, Travers P. Immunobiology: the immune system in health and disease. 5<sup>th</sup> edition. New York: Churcill Livingstone, 2001: 473-481
  33. Petersen LJ, Mosbech H, skov PS. Allergen-induced histamine release in intact human skin in vivo assessed by skin microdialysis technique: characterization of factors influencing histamine releasability. J Allergy Clin Immunol 97. 1996: 672-9
  34. Roitt I, Delves PJ. Essential immunology. 10<sup>th</sup> edition. Oxford: Blackwell Science Ltd, 2001:322-48
  35. Casolaro V, Georas SN, Song Z, Ono SJ. Biology and genetics of atopic disease. Current opinion in Immunol 1996; 19; 8: 796-803
  36. Cruse JM, Lewis RE. Molecules, cells, and tissues of the immune respons. In: Atlas of immunology. Second edition. CRC Press LLC, 2004: 38, 68
  37. Rosenberg H. Inflammation. In: Paul WE, editor. Fundamental immunology. 5<sup>th</sup> edition. Lippincott Williams & Wilkins Publishers, 2003: 45
  38. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Immediate hypersensitivity. In: Cellular and molecular immunology. 4<sup>th</sup> edition. Philadelphia: WB Saunders Co, 2000; 424-44
  39. Xie H, He S. Roles of histamine and its receptors in allergic and inflammatory bowel diseases. World J Gastroenterol 2005;11(19): 2851-2857
  40. He S, Walls AF: Potent induction of neutrophil and eosinophil infiltration in vivo by human mast cell tryptase, J Immunol, in press.

41. Kumar V, Abbas AK, Fausto N. Acute and chronic inflammation. In: Pathologic basis of disease. 7th edition. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2005: 53-59, 61
42. Abelson MB, Schaefer K. Conjunctivitis of allergic origin: immunologic mechanism and current approaches to therapy. *Surv Ophthalmol*, 38 (Suppl.). 1993: 115
43. Thorlacius H, Raud J, Rosengren-Beezley S, Forrest MJ, et al. mast cell activation induces P-selectin-dependent leukocyte rolling and adhesion in postcapillary venules in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 203: 1043
44. Sohn J, Kim TI, Yoon YH, Kim JY, Kim SY. Novel transglutaminase inhibitors reverse the inflammation of allergic conjunctivitis. *J Clin Invest* 2003; 111: 121-8
45. Sigma-aldrich. Biochemicals and reagents for life science research. Sigma-Aldrich Co. 2002-2003: 534
46. Choi YH, et al. Inhibition of anaphylaxis-like reaction and mast cell activation by water extract from fruiting body of *Phellinus linteus*. *Boil Pharm Bull* 2006; 29(7): 1360-5
47. Li GZ, Chai OH, Song CH. Inhibitory effects of epigallocatechin gallate on compound 48/80-induced mast cell activation and passive cutaneous anaphylaxis. *Exp Mol Med* 2005; 37(4): 290-6
48. Balentine D. Tea and health. *Crit Rev Food Sci Nutr* 1997; 37: 691-692
49. Balentine D, Wiseman S, Bouwens L. The chemistry of tea flavonoids. *Crit Rev Food Sci Nutr* 1997; 37: 693-704.
50. Beecher GR, Warden AB, Merken HM. Analysis of tea polyphenols. *P.S.E.B.M.* 1999 VOL 220
51. Johan A, Susilaningsih N, Gunardi. Penelitian in vitro efek polifenol teh hijau terhadap mekanisme pertahanan tubuh pada mencit yang diinokulasi *L. Monocytogenes*. Laporan akhir penelitian DCRG Proyek URGE 2000/2001



52. Yang F, Villiers WJ, McClain CJ, Varilek GW. Green tea polyphenols block endotoxin-induced tumor necrosis factor-production and lethality in a murine model. *J Nutr* 1998; 128: 2334
53. Dona M, Dell'Aica I, Calabrese F, Benelli R, Morini M, Albini A, Garbisa S. Neutrophil restraint by green tea: inhibition of inflammation, associated angiogenesis, and pulmonary fibrosis. *J Immunol* 2003; 170: 4335
54. Sartor L, Pezzato E, Garbisa S. (-)Epigallocatechin-3-gallate inhibits leukocyte elastase: phytofactor for hindering inflammation, emphysema and invasion. *J. Leukocyte Biol* 2002; 71: 73
55. Ludwig A, Lorenz M, Grimbo N, Steinle F, Meiners S, Bartsch C, et al. The tea flavonoid, epigallocatechin-3-gallate, reduces cytokine-induced VCAM-1 expression and monocyte adhesion to endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 316: 659-65
56. Sakagami H, Asano K, Hara Y, et al. Stimulation of human monocyte and polymorphonuclear cell iodination and interleukin-1 production by epigallocatechin gallate. *J Leukocyte Biol* 1992; 51: 478-483
57. Kawai K, Tsuno NH, Kitayama J, Okaji Y, Yazawa K, Asakage M, et al. Epigallocatechin gallate attenuates adhesion and migration of CD8[+] T cells by binding to CD11b. *J Allergy Clin Immunol.* 2004; 113(6): 1211-1217
58. Sakagami H, Takeda M. Stimulation by epigallocatechin gallate of interleukin production by human peripheral blood mononuclear cell. *Anticancer Res* 1995; 15: 971-974
59. Hofbauer R, Frass M, Gmeiner B, Handler S, Speiser W, Kapiotis S. The green tea extract epigallocatechin gallate is able to reduce neutrophil transmigration through monolayers of endothelial cells. *Wien Klin Wochenschr* 1999; 111: 278
60. Katiyar SA, Challa TS. Prevention of UVB-induced immunosuppression in mice by the green tea polyphenol (-) epigallocatechin-3-gallate may be associated with alterations in IL-10 and IL-12 production. *Carcinogenesis* 1999; 20: 2117-24

61. Shiozaki T, sugiyama K. Effect of tea extract, catechin, and caffeine against type-1 allergic reaction. *Yakugaku Zasshi* 1997 Jul; 112(7): 448-54
62. Matsuo N, Yamada K, Shoji K, et al. Effect of tea polyphenols on histamine release from rat basophilic leukemia 9RBL-2H3 cells: the structure-inhibitory activity relationship. *Allergy* 1997; 52: 58-64
63. Tachibana H, Sunada Y. Identification of methylated tea catechin as an inhibitor of degranulation in human basophilic KU812 cells. *J Biosci Biotechnol Biochem* 2000 Feb; 64(2): 452-4
64. Katsuhiko T, Keiko N, Makoto N, Futoshi S, Hideo N. Inhibitory effect of (-)-epigallocatechin-3-gallate a polyphenol of green tea, on neutrophil chemotaxis in vitro and in vivo. *J Agric Food Chem* 2004; 52(14): 4571-4576
65. Kim SH, Jun CD, Suk K, Choi BJ, Lim H, Park S, et al. Gallic acid inhibits histamine release and pro-inflammatory cytokine production in mast cell. *ToxSci Advance Access*, Published by Oxford University Press on behalf of the Society of Toxicology 2005
66. Stokes WS. Mechanisms of chemically-induced ocular injury and recovery. Bethesda: National Institutes of Health; 2005 May
67. Strocchi P, Dozza B, Pecorella I, Fresina M, Campos E, Stirpe F. Lesions caused by ricin applied to rabbit eyes. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 2005; 46:1113-1116
68. Stratton SP, Bangert JL, Alberts DS, Dorr RT. Dermal toxicity of topical (-)epigallocatechin-3-gallate in BALB/c and SKH1 mice. *Cancer Lett* 2000; 158: 47-52

## LAMPIRAN

### Lampiran 1

#### Rerata jumlah neutrofil pada jaringan konjungtiva tiap lapangan pandang

Kelompok	Nomor tikus (preparat)	Rerata jumlah neutrofil per lapangan pandang
K	1	22
	2	17
	3	14
	4	22
	5	17
	6	13
P1	1	10
	2	9
	3	11
	4	16
	5	11
	6	13
P2	1	10
	2	6
	3	3
	4	6
	5	5
	6	5
P3	1	51
	2	44
	3	36
	4	31
	5	42
	6	58

## Lampiran 2

### Hasil Uji Statistik

Tabel 1. Deskripsi data sebulan neutrofil

#### Descriptives

Kelompok			Statistic	Std. Error
Neutrofil / LPB K	K	Mean	17.5000	1.56525
		95% Confidence Interval for Mean	13.4764	
		Lower Bound	21.5236	
		Upper Bound		
		5% Trimmed Mean	17.5000	
		Median	17.0000	
		Variance	14.700	
		Std. Deviation	3.83406	
		Minimum	13.00	
		Maximum	22.00	
		Range	9.00	
		Interquartile Range	8.25	
		Skewness	.255	.845
		Kurtosis	-1.778	1.741
P1	P1	Mean	11.6667	1.02198
		95% Confidence Interval for Mean	9.0396	
		Lower Bound	14.2938	
		Upper Bound		
		5% Trimmed Mean	11.5741	
		Median	11.0000	
		Variance	6.267	
		Std. Deviation	2.50333	
		Minimum	9.00	
		Maximum	16.00	
		Range	7.00	
		Interquartile Range	4.00	
		Skewness	1.139	.845
		Kurtosis	1.137	1.741
P2	P2	Mean	5.8333	.94575
		95% Confidence Interval for Mean	3.4022	
		Lower Bound	8.2645	
		Upper Bound		
		5% Trimmed Mean	5.7593	
		Median	5.5000	
		Variance	5.367	
		Std. Deviation	2.31661	

	Minimum		3.00	
	Maximum		10.00	
	Range		7.00	
	Interquartile Range		2.50	
	Skewness		1.169	.845
	Kurtosis		2.665	1.741
P3	Mean		43.6667	4.00555
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	33.3701	
		Upper Bound	53.9633	
	5% Trimmed Mean		43.5741	
	Median		43.0000	
	Variance		96.267	
	Std. Deviation		9.81156	
	Minimum		31.00	
	Maximum		58.00	
	Range		27.00	
	Interquartile Range		18.00	
	Skewness		.270	.845
	Kurtosis		-.637	1.741

Tabel 2. Uji distribusi data sebulan neutrofil dengan *Kolmogorov-Smirnov*

#### Tests of Normality

Kelompok		Kolmogorov-Smirnov(a)		
		Statistic	df	Sig.
Neutrofil / LPB	K	.219	6	.200(*)
	P1	.272	6	.189
	P2	.305	6	.086
	P3	.153	6	.200(*)

\* This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Tabel 3. Uji homogenitas varians data sebulan neutrofil

#### Test of Homogeneity of Variances

Neutrofil / LPB

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
4.274	3	20	.017

Tabel 4. Uji homogenitas varians data sebulan neutrofil hasil transformasi

**Test of Homogeneity of Variances**

trn\_neutrofil

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.514	3	20	.677

Tabel 5. Uji *One-Way ANOVA*

**ANOVA**

trn\_neutrofil

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2.489	3	.830	60.025	.000
Within Groups	.276	20	.014		
Total	2.766	23			

Tabel 6. Uji *Post Hoc (Bonferroni)*

**Multiple Comparisons**

Dependent Variable: trn\_neutrofil  
Bonferroni

(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Upper Bound	Lower Bound
K	P1	.17512	.06788	.107	-.0236	.3738
	P2	.49574(*)	.06788	.000	.2970	.6944
	P3	-.39659(*)	.06788	.000	-.5953	-.1979
P1	K	-.17512	.06788	.107	-.3738	.0236
	P2	.32062(*)	.06788	.001	.1219	.5193
	P3	-.57171(*)	.06788	.000	-.7704	-.3730
P2	K	-.49574(*)	.06788	.000	-.6944	-.2970
	P1	-.32062(*)	.06788	.001	-.5193	-.1219
	P3	-.89233(*)	.06788	.000	-1.0910	-.6936
P3	K	.39659(*)	.06788	.000	.1979	.5953
	P1	.57171(*)	.06788	.000	.3730	.7704
	P2	.89233(*)	.06788	.000	.6936	1.0910

\* The mean difference is significant at the .05 level.

